

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12Q1/68

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 91 10675 A (STICHTING RES FONDS PATHOLOGIE) 25. Juli 1991	1-4, 10-12, 14, 16, 17, 19 8, 9
Y	siehe Seite 4, Zeile 8 - Seite 5, Zeile 17 siehe Seite 8, Zeile 14 - Seite 9, Zeile 16 siehe Seite 12, Zeile 13 - Seite 13, Zeile 7 siehe Seite 14 - Seite 20, Zeile 28 ---	
Y	US 5 538 848 A (LIVAK KENNETH J ET AL) 23. Juli 1996 siehe das ganze Dokument ---	8
Y	EP 0 070 685 A (STANDARD OIL CO) 26. Januar 1983 siehe Zusammenfassung; Abbildung 2 ---	9
	--- -/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. Mai 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

02/06/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Reuter, U

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 527 898 A (BAUER HEIDI M ET AL) 18. Juni 1996 siehe Spalte 8, Zeile 22 - Spalte 9, Zeile 5 siehe Spalte 10, Zeile 26 - Spalte 11, Zeile 30 siehe Spalte 17, Zeile 48 - Spalte 18, Zeile 61; Beispiele 1,3 ---	1,4,6,7, 10-14, 16-19
X	WO 96 29431 A (SEQUENOM INC) 26. September 1996 siehe Seite 41, Zeile 15 - Seite 44, Zeile 22; Abbildungen 5,21; Beispiel 5 siehe Seite 15, Zeile 18 - Seite 16, Zeile 4 ---	15
A	EP 0 229 701 A (CETUS CORP) 22. Juli 1987 siehe Beispiel 2 -----	5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/06951

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9110675	A	25-07-1991	NL 9000134 A	16-08-1991
			AT 137809 T	15-05-1996
			AU 645286 B	13-01-1994
			AU 7071691 A	05-08-1991
			CA 2074069 A	20-07-1991
			DE 69119408 D	13-06-1996
			DE 69119408 T	05-12-1996
			DK 517704 T	09-09-1996
			EP 0517704 A	16-12-1992
			ES 2088483 T	16-08-1996
			GR 3020302 T	30-09-1996
			US 5364758 A	15-11-1994
US 5538848	A	23-07-1996	AU 695561 B	13-08-1998
			AU 4283696 A	06-06-1996
			CA 2201756 A	23-05-1996
			EP 0792374 A	03-09-1997
			JP 10510982 T	27-10-1998
			WO 9615270 A	23-05-1996
			US 5876930 A	02-03-1999
			US 5723591 A	03-03-1998
EP 0070685	A	26-01-1983	CA 1190838 A	23-07-1985
			JP 1651448 C	30-03-1992
			JP 3017480 B	08-03-1991
			JP 58023795 A	12-02-1983
US 5527898	A	18-06-1996	US 5447839 A	05-09-1995
			US 5182377 A	26-01-1993
			US 5639871 A	17-06-1997
			US 5705627 A	06-01-1995
			AT 138108 T	15-06-1996
			AU 645483 B	20-01-1994
			AU 4401189 A	02-04-1990
			CA 1339262 A	12-08-1997
			DE 68926507 D	20-06-1996
			DE 68926507 T	16-01-1997
			EP 0433396 A	26-06-1991
			JP 2651483 B	10-09-1997
			JP 4500910 T	20-02-1992
			WO 9002821 A	22-03-1990
			US 5283171 A	01-02-1993
WO 9629431	A	26-09-1996	US 5605798 A	25-02-1997
			AU 5365196 A	08-10-1996
			CA 2214359 A	26-09-1996
			CN 1202204 A	16-12-1998
			EP 0815261 A	07-01-1998
EP 0229701	A	22-07-1987	AT 127857 T	15-09-1995
			AU 606043 B	31-01-1991
			AU 6710987 A	16-07-1987
			CA 1279244 A	22-01-1991
			DE 3751513 D	19-10-1995
			DE 3751513 T	28-03-1996
			DK 10787 A	11-07-1987
			ES 2078214 T	16-12-1995
			IE 69565 B	02-10-1996

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/06951

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0229701 A		JP 2576980 B	29-01-1997
		JP 62217161 A	24-09-1987
		JP 2574640 B	22-01-1997
		JP 6233700 A	23-08-1994
		US 5386022 A	31-01-1995
		US 5594123 A	14-01-1997
		US 5176995 A	05-01-1993
		US 5008182 A	16-04-1991
<hr/>			



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12Q 1/68		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/23249
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. Mai 1999 (14.05.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06952		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 3. November 1998 (03.11.98)			
(30) Prioritätsdaten: 197 48 690.8 4. November 1997 (04.11.97) DE 198 14 001.0 28. März 1998 (28.03.98) DE 198 14 828.3 2. April 1998 (02.04.98) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe- richts: 10. September 1999 (10.09.99)	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KESSLER, Christoph [DE/DE]; Schlossbergweg 11, D-82057 Icking (DE). HABERHAUSEN, Gerd [DE/DE]; Jochbergweg 2, D-82393 Iffeldorf (DE). BARTL, Knut [DE/DE]; Am Westend 6, D-82407 Wielenbach (DE). ORUM, Henrik [DK/DK]; Vildrosevej 3, DK-3500 Værløse (DK).		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(74) Gemeinsamer Vertreter: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH, Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).			
(54) Title: SPECIFIC AND SENSITIVE METHOD FOR DETECTING NUCLEIC ACIDS			
(54) Bezeichnung: SPEZIFISCHES UND EMPFINDLICHES NUKLEINSÄURENACHWEISVERFAHREN			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to a method for detecting a nucleic acid comprising the production of a plurality of amplifications of a section of said nucleic acid with the assistance of two primers of which one can bond on a bonding sequence A of the nucleic acid and the other can bond on a bonding sequence C' which is complementary to a sequence C. Sequence C does not overlap A and is situated in a 3' direction from A. The inventive method also includes bringing the amplifications in contact with a probe having a bonding sequence D which can bond on a sequence B, said sequence B being situated between sequences A and C, or the complement thereof. In addition, the invention relates to the detection of the construction of a hybrid out of the amplification and the probe, whereby the sequence situated between the bonding sequences A and C contains no nucleotides, said nucleotides not being linked to the bonding sequence D of the probe or to complement D' thereof.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine Bindesequenz A der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine Bindesequenz C', die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C komplementär ist, binden kann, Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an eine zwischen den Sequenzen A und C gelegene Sequenz B oder das Komplement davon binden kann, und Nachweis der Bildung eines Hybrides aus dem Amplifikat und der Sonde, wobei die zwischen den Bindesequenzen A und C gelegene Sequenz keine Nukleotide enthält, die nicht der Bindesequenz D der Sonde oder ihrem Komplement D' zugehören.</p>			

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 4817/00/WO-Kn	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/06951	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 03/11/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 04/11/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.		


- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 09/03/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 26. 01. 00
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter von Ballmoos, P Tel. Nr. +49 89 2399 8174

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/06951

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-45 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-18 eingegangen am 13/01/2000 mit Schreiben vom 10/01/2000

Zeichnungen, Blätter:

1/7-7/7 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- | | | | |
|-------------------------------------|---------------|---------|----|
| <input type="checkbox"/> | Beschreibung, | Seiten: | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Ansprüche, | Nr.: | 19 |
| <input type="checkbox"/> | Zeichnungen, | Blatt: | |

3. ☒ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

siehe Beiblatt

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-15
	Nein: Ansprüche	16-18
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-15
	Nein: Ansprüche	16-18
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-18
	Nein: Ansprüche	---

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

Teil I.1

Das Sequenzprotokoll auf den Seiten 1-3 wurde am Anmeldetag eingereicht und wird somit als Teil der Beschreibung betrachtet (Regel 13ter.1(f) PCT).

Teil I.3

Der unabhängige Anspruch 16 sowie die davon abhängigen Ansprüche erfüllen nicht die Erfordernisse des Artikels 34(2)(b) PCT.

In den Anspruch 16 wurden die folgenden Merkmale aufgenommen:

1. "die Gesamtlänge des Amplifikats ist kürzer als 100 Nukleotide"

Das Merkmal der Amplifikatlänge von kürzer als 100 Basenpaaren kommt in den ursprünglichen Unterlagen nur vor im Zusammenhang mit Methoden, bei welchen die Sonde mit der gesamten amplifizierten Sequenz, die zwischen den Primern liegt, hybridisiert. Dieses Merkmal fehlt jedoch in Anspruch 16, wodurch allgemeinere PCR-Methoden mit einer Amplifikatlänge von kürzer als 100 Basenpaaren umfasst werden. Solche Methoden sind jedoch nicht ursprünglich offenbart.

Fig. 4/7 zeigt zwar ein Amplifikat kürzer als 100 Nukleotide sowie Oligonukleotide (siehe dort zweite, vierte und zweitunterste Zeile), welche nicht im gesamten Bereich, der zwischen den Primern liegt, hybridisiert. Dies kann jedoch nicht als Basis für den veränderten Anspruch dienen: Ausser in einer allgemeinen Bezugnahme auf Seite 12 scheint Fig. 4/7 nirgends in der Beschreibung erwähnt zu sein, so dass nicht klar ist, ob die erwähnten Oligonukleotide tatsächlich als Sonden in einem Experiment der vorliegenden Anmeldung eingesetzt wurden. Im Gegensatz zur Aussage des Anmelders scheint die Sonde MPF2 in keinem Experiment der vorliegenden Anmeldung verwendet worden zu sein.

Zudem wird in der gesamten Beschreibung die "Erfindung" dadurch definiert, dass die Sonde mit der gesamten amplifizierten Sequenz, die zwischen den Primern liegt, hybridisiert (siehe Seite 20, Zeile 25 bis Seite 22 unten; Figur 2/7 und die entsprechende Legende; Beispiele 1c, 1d in Verbindung mit Figur 4 und Figur 8 sowie

Seite 23, Zeile 1-10). Der veränderte Anspruch 16 steht somit im Widerspruch zur gesamten Lehre der Anmeldung.

2. "der Bereich des Amplifikats, der nicht von den Primern und der Sonde abgedeckt ist, weist eine Länge von 0 bis 3 Nukleotiden auf".

Dieses Merkmal verstösst ebenfalls gegen Art. 34(2)(b), da es keine Basis gibt, um die in Figur 4/7 gezeigten drei Einzelwerte (der nicht abgedeckte Teil des Amplifikats hat eine Länge von 0, 1 oder 3 Nukleotiden) auf einen Werte-Bereich zu verallgemeinern.

Die Prüfung wurde deshalb auf Basis der ursprünglich eingereichten Ansprüche 16-18 sowie der veränderten Ansprüche 1-15 durchgeführt.

Teil V

Folgende Dokumente werden in diesem Bescheid erwähnt:

- D1 WO-A-91 10675
- D2 US-A-5 527 898

a) Ansprüche 16-18

D1 beschreibt die Detektion von Papillomavirus (HPV) Genotypen mittels PCR. Dazu werden unspezifische Primer verwendet, die einen breiten Bereich von HPV Genotypen erkennen können (siehe Seite 10, Zeile 28-32; Seite 14), und für den Nachweis werden unspezifische Sonden eingesetzt (Seite 12, Zeile 14-17 und Beispiele).

Als Primerpaare vorgeschlagen werden GP5 und GP6 oder GP1 und GP2. Diese Primer haben je einen Länge von 20 Nucleotiden. Alternative Primer haben zusätzliche Sequenzen (z.B. mit Restriktionsschnittstellen) an ihrem 5'-Ende (siehe z.B. Anspruch 5).

Die Methode umfasst folgende Schritte (siehe Seiten 14 -15):

- PCR mit GP5 und GP6 (entsprechend den Primern der vorliegenden Anmeldung, die an A und C' binden)

- Agarose Gelelektrophorese und Blotting der PCR Produkte
- Hybridisieren der Amplifikate mit einer unspezifischen Sonde. Diese ist ein GP5/GP6 kontrolliertes, HPV-spezifisches PCR-Amplifikat, das mit ^{32}P markiert wurde. Die Sonde bindet somit an den gesamten zwischen den Primern liegenden Bereich und an die Bindesequenzen der beiden Primer.

Somit nimmt D1 den Gegenstand der Ansprüche 16-18 neuheitsschädlich vorweg (Art. 33(2) PCT).

D2 beschreibt ein ähnliches Verfahren wie D1. Detektion von HPV mittels PCR wird mit consensus Primern durchgeführt. Lange generische Sonden erlauben eine Typus-unspezifische Detektion (Zusammenfassung). Die langen generischen Sonden umfassen die ganze HPV genomische Sequenz, die zwischen den HPV Amplifikationsprimern liegt, aber nicht die Sequenzen, die den Primerregionen entsprechen.

Folgende Schritte werden durchgeführt:

- Amplifikation der HPV Sequenzen mit den L1 consensus Primern MY09 und MY11
- Nachweis der Amplifikationsprodukte durch Hybridisierung mit den generischen langen HPV Sonden.

Sowohl die Sonden als auch die Primer können ^{32}P -markiert oder biotinyliert sein. (Siehe die im Recherchenbericht zitierten Stellen).

Damit offenbart D2 alle technischen Merkmale der Ansprüche 16-18 und nimmt ihre Neuheit vorweg (Art. 33(2) PCT).

b) Ansprüche 1-15

Anspruch 1 bezieht sich auf ein Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure, welche auf einer PCR-Reaktion und anschliessender Hybridisierung mit einer Sonde beruht. Es ist dadurch gekennzeichnet, dass die Sonde mit der gesamten amplifizierten Sequenz, die zwischen den Primern liegt, hybridisiert und das Amplifikat kürzer als 100 Nukleotiden ist.

D1 und D2 zeigen ähnliche Verfahren, wobei das Amplifikat in D1 eine Länge von 140 Nukleotiden aufweist (siehe beispielsweise Seiten 19-20) und in D2 allein schon die Sonden (ohne Einrechnung der Primersequenzen) länger als 100 Nukleotide sind, normalerweise 100-600 (siehe Spalte 8). Bei Berücksichtigung einer durchschnittlichen Primerlänge von 20 Nukleotiden, ergibt sich in D2 eine Amplifikatlänge von 140-640 Nukleotiden.

Anspruch 1 ist deshalb neu (Art. 33(2) PCT).

Die Verkürzung der Amplifikate führt zu den Vorteilen, die in der Anmeldung auf Seite 36, Zeile 11-Seite 37, Zeile 24 beschrieben sind.

Es scheint, dass der Fachmann keinen Anlass gehabt hätte, die Verkürzung durchzuführen, da keines der im Recherchenbericht erwähnten Dokumente einen entsprechenden Hinweis gibt. Zudem bestätigen die vom Anmelder angeführten Dokumente (PCR Primer, A Laboratory Manual, CSHL Press 1995, ISBN 0-87969-448-3, Seiten 133-142; Nucleic Acid Research, 18, 1990, 6409-6412) die Meinung, dass für diagnostische Verfahren Amplifikate mit einer Länge von 120-250bp zu verwenden sind und dass die Ausbeute der synthetisierten Amplifikate bei einer Länge von 135bp bis 5kbp ansteigt.

Der Fachmann wäre deshalb von einer Methode gemäss Anspruch 1 abgehalten worden.

Ansprüche 2-15 sind von Anspruch 1 abhängig und erfüllen somit auch die Erfordernisse der Artikel 33(2) und (3) PCT.

Teil VII

- a) Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D1-D2 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.
- b) Der Ausdruck "auf den Offenbarungsgehalt dieser Anmeldungen wird ausdrücklich Bezug genommen" wird in gewissen Fällen beim Eintritt in die

ationale oder regionale Phase gestrichen werden müssen (siehe z.B. die Richtlinien für die Prüfung im EPA, C-II, 4.18).

Teil VIII

Die Einschätzung, dass das folgende Merkmal für die Definition der Erfindung wesentlich ist, wird beibehalten:

Die Sonde muss mit der gesamten amplifizierten Sequenz, die zwischen den Primern liegt, hybridisieren.

Der Anmelder argumentiert, dass allein die Verkleinerung der Amplifikate auf eine Gesamtlänge kürzer als 100 Basenpaare wesentlich ist für die Erfindung. Dem wird nicht zugestimmt, da in der Beschreibung die "Erfindung" durchweg durch das obengenannte Merkmal definiert wird (siehe Seite 20, Zeile 25 bis Seite 22 unten; Figur 2 und die entsprechende Legende; Beispiele 1c, 1d in Verbindung mit Figur 4 und Figur 8).

Da der unabhängige Anspruch 16 dieses Merkmal nicht enthält, entspricht er nicht dem Erfordernis des Artikels 6 PCT in Verbindung mit Regel 6.3 b) PCT, dass jeder unabhängige Anspruch alle technischen Merkmale enthalten muss, die für die Definition der Erfindung wesentlich sind.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Schritte
 - Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine Bindesequenz (A) eines Stranges der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine Bindesequenz C', die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C im wesentlichen komplementär ist, binden kann,
 - Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an die zwischen den Sequenzen A und C gelegene Sequenz B oder das Komplement davon binden kann, und
 - Nachweis der Bildung eines Hybrides aus einem Amplifikat und der Sonde, dadurch gekennzeichnet, daß die zwischen den Bindesequenzen A und C gelegene Sequenz keine Nukleotide enthält, die nicht dem aus der Bindesequenz D der Sonde und der hiervon gebundenen Sequenz des Amplifikats gebildeten Sequenzbereich E zugehören und das Amplifikat kürzer als 100 Nukleotide ist.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindesequenz D der Sonde mit einer oder beiden Bindesequenzen der Primer überlappt.
3. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer an seinem nicht verlängerbaren Teil Nukleotide aufweist, die nicht direkt mit der nachzuweisenden Nukleinsäure oder ihrem Komplement hybridisieren.
4. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Bindesequenzen nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist.

GEÄNDERTES BLATT

5. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Gesamtlänge des Amplifikats kürzer als 60 Nukleotide ist.
6. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer immobilisierbar und die Sonde nachweisbar markiert ist.
7. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nachweisbar und die Sonde immobilisierbar markiert oder immobilisiert ist.
8. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde sowohl durch einen Fluoreszenzquencher als auch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist.
9. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß einer der Primer durch eine erste Energietransferkomponente und die Sonde durch eine zweite, davon verschiedene Energietransferkomponente markiert ist.
10. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikat durch physikalische und/oder spektroskopische Methoden detektiert wird.
11. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß zwei der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch sind.

GEÄNDERTES BLATT

13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde nicht spezifisch ist für die nachzuweisende Nukleinsäure.
14. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der Amplifikation jeweils zu A, G, C und T komplementäre Nukleotide eingesetzt werden.
15. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der Amplifikate mittels Massenspektroskopie erfolgt.
16. Verfahren zum spezifischen Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Schritte
 - Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe mindestens zweier Primer,
 - Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde, welche an das Amplifikat binden kann, und
 - Nachweis der Bildung eines Hybrides aus dem Amplifikat und der Sonde,dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nicht für die Gruppe von Organismen spezifisch ist, der der nachzuweisende Organismus angehört, die Gesamtlänge des Amplifikats kürzer als 100 Nukleotide ist und der Bereich des Amplifikats, der nicht von den Primern und der Sonde abgedeckt ist, eine Länge von 0 bis 3 Nukleotiden aufweist.
17. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zwei der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch sind.
18. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde nicht spezifisch ist für die nachzuweisende Nukleinsäure.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 20 May 1999 (20.05.99)	
International application No.: PCT/EP98/06951	Applicant's or agent's file reference: 4817/00/WO-Kn
International filing date: 03 November 1998 (03.11.98)	Priority date: 04 November 1997 (04.11.97)
Applicant: KESSLER, Christoph et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
09 March 1999 (09.03.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>J. Zahra</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	--

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 4817/00/WO-Kn	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 98/ 06951	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 03/11/1998	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 04/11/1997
Anmelder ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
- ☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- ☒ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1, 2
- ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen ☐ keine der Abb.
- ☒ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
Patentabteilung
D-68298 Mannheim
ALLEMAGNE

K	Roche Diagnostics GmbH				Ab
Jg	Patentabteilung				Hi
Si	28. Jan. 2000				Wu
Kn	Et				Pla
P	Kö	Ki	S	Sz	Im
					Wb

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

26. 01. 00

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
4817/00/WO-Kn

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP98/06951

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
03/11/1998

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
04/11/1997

Anmelder

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde

 Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Digiusto, M

Tel. +49 89 2399-8162



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 4817/00/WO-Kn	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/06951	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 03/11/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 04/11/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.		



1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 09/03/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 26. 01. 00
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter von Ballmoos, P Tel. Nr. +49 89 2399 8174 

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/06951

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-45 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-18 eingegangen am 13/01/2000 mit Schreiben vom 10/01/2000

Zeichnungen, Blätter:

1/7-7/7 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☒ Ansprüche, Nr.: 19 ✓
☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☒ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

siehe Beiblatt

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-15
	Nein: Ansprüche	16-18
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-15
	Nein: Ansprüche	16-18
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-18
	Nein: Ansprüche	---

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

Teil I.1

Das Sequenzprotokoll auf den Seiten 1-3 wurde am Anmeldetag eingereicht und wird somit als Teil der Beschreibung betrachtet (Regel 13ter.1(f) PCT).

Teil I.3

Der unabhängige Anspruch 16 sowie die davon abhängigen Ansprüche erfüllen nicht die Erfordernisse des Artikels 34(2)(b) PCT.

In den Anspruch 16 wurden die folgenden Merkmale aufgenommen:

1. "die Gesamtlänge des Amplifikats ist kürzer als 100 Nukleotide"

Das Merkmal der Amplifikatlänge von kürzer als 100 Basenpaaren kommt in den ursprünglichen Unterlagen nur vor im Zusammenhang mit Methoden, bei welchen die Sonde mit der gesamten amplifizierten Sequenz, die zwischen den Primern liegt, hybridisiert. Dieses Merkmal fehlt jedoch in Anspruch 16, wodurch allgemeinere PCR-Methoden mit einer Amplifikatlänge von kürzer als 100 Basenpaaren umfasst werden. Solche Methoden sind jedoch nicht ursprünglich offenbart.

Fig. 4/7 zeigt zwar ein Amplifikat kürzer als 100 Nukleotide sowie Oligonukleotide (siehe dort zweite, vierte und zweitunterste Zeile), welche nicht im gesamten Bereich, der zwischen den Primern liegt, hybridisiert. Dies kann jedoch nicht als Basis für den veränderten Anspruch dienen: Ausser in einer allgemeinen Bezugnahme auf Seite 12 scheint Fig. 4/7 nirgends in der Beschreibung erwähnt zu sein, so dass nicht klar ist, ob die erwähnten Oligonukleotide tatsächlich als Sonden in einem Experiment der vorliegenden Anmeldung eingesetzt wurden. Im Gegensatz zur Aussage des Anmelders scheint die Sonde MPF2 in keinem Experiment der vorliegenden Anmeldung verwendet worden zu sein.

Zudem wird in der gesamten Beschreibung die "Erfindung" dadurch definiert, dass die Sonde mit der gesamten amplifizierten Sequenz, die zwischen den Primern liegt, hybridisiert (siehe Seite 20, Zeile 25 bis Seite 22 unten; Figur 2/7 und die entsprechende Legende; Beispiele 1c, 1d in Verbindung mit Figur 4 und Figur 8 sowie

Seite 23, Zeile 1-10). Der veränderte Anspruch 16 steht somit im Widerspruch zur gesamten Lehre der Anmeldung.

2. "der Bereich des Amplifikats, der nicht von den Primern und der Sonde abgedeckt ist, weist eine Länge von 0 bis 3 Nukleotiden auf".

Dieses Merkmal verstösst ebenfalls gegen Art. 34(2)(b), da es keine Basis gibt, um die in Figur 4/7 gezeigten drei Einzelwerte (der nicht abgedeckte Teil des Amplifikats hat eine Länge von 0, 1 oder 3 Nukleotiden) auf einen Werte-Bereich zu verallgemeinern.

Die Prüfung wurde deshalb auf Basis der ursprünglich eingereichten Ansprüche 16-18 sowie der veränderten Ansprüche 1-15 durchgeführt.

Teil V

Folgende Dokumente werden in diesem Bescheid erwähnt:

- D1 WO-A-91 10675
- D2 US-A-5 527 898

a) Ansprüche 16-18

D1 beschreibt die Detektion von Papillomavirus (HPV) Genotypen mittels PCR. Dazu werden unspezifische Primer verwendet, die einen breiten Bereich von HPV Genotypen erkennen können (siehe Seite 10, Zeile 28-32; Seite 14), und für den Nachweis werden unspezifische Sonden eingesetzt (Seite 12, Zeile 14-17 und Beispiele).

Als Primerpaare vorgeschlagen werden GP5 und GP6 oder GP1 und GP2. Diese Primer haben je einen Länge von 20 Nucleotiden. Alternative Primer haben zusätzliche Sequenzen (z.B. mit Restriktionsschnittstellen) an ihrem 5'-Ende (siehe z.B. Anspruch 5).

Die Methode umfasst folgende Schritte (siehe Seiten 14 -15):

- PCR mit GP5 und GP6 (entsprechend den Primern der vorliegenden Anmeldung, die an A und C' binden)

- Agarose Gelelektrophorese und Blotting der PCR Produkte
- Hybridisieren der Amplifikate mit einer unspezifischen Sonde. Diese ist ein GP5/GP6 kontrolliertes, HPV-spezifisches PCR-Amplifikat, das mit ^{32}P markiert wurde. Die Sonde bindet somit an den gesamten zwischen den Primern liegenden Bereich und an die Bindesequenzen der beiden Primer.

Somit nimmt D1 den Gegenstand der Ansprüche 16-18 neuheitsschädlich vorweg (Art. 33(2) PCT).

D2 beschreibt ein ähnliches Verfahren wie D1. Detektion von HPV mittels PCR wird mit consensus Primern durchgeführt. Lange generische Sonden erlauben eine Typus-unspezifische Detektion (Zusammenfassung). Die langen generischen Sonden umfassen die ganze HPV genomische Sequenz, die zwischen den HPV Amplifikationsprimern liegt, aber nicht die Sequenzen, die den Primerregionen entsprechen.

Folgende Schritte werden durchgeführt:

- Amplifikation der HPV Sequenzen mit den L1 consensus Primern MY09 und MY11
- Nachweis der Amplifikationsprodukte durch Hybridisierung mit den generischen langen HPV Sonden.

Sowohl die Sonden als auch die Primer können ^{32}P -markiert oder biotinyliert sein. (Siehe die im Recherchenbericht zitierten Stellen).

Damit offenbart D2 alle technischen Merkmale der Ansprüche 16-18 und nimmt ihre Neuheit vorweg (Art. 33(2) PCT).

b) Ansprüche 1-15

Anspruch 1 bezieht sich auf ein Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure, welche auf einer PCR-Reaktion und anschliessender Hybridisierung mit einer Sonde beruht. Es ist dadurch gekennzeichnet, dass die Sonde mit der gesamten amplifizierten Sequenz, die zwischen den Primern liegt, hybridisiert und das Amplifikat kürzer als 100 Nukleotiden ist.

D1 und D2 zeigen ähnliche Verfahren, wobei das Amplifikat in D1 eine Länge von 140 Nukleotiden aufweist (siehe beispielsweise Seiten 19-20) und in D2 allein schon die Sonden (ohne Einrechnung der Primersequenzen) länger als 100 Nukleotide sind, normalerweise 100-600 (siehe Spalte 8). Bei Berücksichtigung einer durchschnittlichen Primerlänge von 20 Nukleotiden, ergibt sich in D2 eine Amplifikatlänge von 140-640 Nukleotiden.

Anspruch 1 ist deshalb neu (Art. 33(2) PCT).

Die Verkürzung der Amplifikate führt zu den Vorteilen, die in der Anmeldung auf Seite 36, Zeile 11-Seite 37, Zeile 24 beschrieben sind.

Es scheint, dass der Fachmann keinen Anlass gehabt hätte, die Verkürzung durchzuführen, da keines der im Recherchenbericht erwähnten Dokumente einen entsprechenden Hinweis gibt. Zudem bestätigen die vom Anmelder angeführten Dokumente (PCR Primer, A Laboratory Manual, CSHL Press 1995, ISBN 0-87969-448-3, Seiten 133-142; Nucleic Acid Research, 18, 1990, 6409-6412) die Meinung, dass für diagnostische Verfahren Amplifikate mit einer Länge von 120-250bp zu verwenden sind und dass die Ausbeute der synthetisierten Amplifikate bei einer Länge von 135bp bis 5kbp ansteigt.

Der Fachmann wäre deshalb von einer Methode gemäss Anspruch 1 abgehalten worden.

Ansprüche 2-15 sind von Anspruch 1 abhängig und erfüllen somit auch die Erfordernisse der Artikel 33(2) und (3) PCT.

Teil VII

- a) Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D1-D2 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.
- b) Der Ausdruck "auf den Offenbarungsgehalt dieser Anmeldungen wird ausdrücklich Bezug genommen" wird in gewissen Fällen beim Eintritt in die

nationale oder regionale Phase gestrichen werden müssen (siehe z.B. die Richtlinien für die Prüfung im EPA, C-II, 4.18).

Teil VIII

Die Einschätzung, dass das folgende Merkmal für die Definition der Erfindung wesentlich ist, wird beibehalten:

Die Sonde muss mit der gesamten amplifizierten Sequenz, die zwischen den Primern liegt, hybridisieren.

Der Anmelder argumentiert, dass allein die Verkleinerung der Amplifikate auf eine Gesamtlänge kürzer als 100 Basenpaare wesentlich ist für die Erfindung. Dem wird nicht zugestimmt, da in der Beschreibung die "Erfindung" durchweg durch das obengenannte Merkmal definiert wird (siehe Seite 20, Zeile 25 bis Seite 22 unten; Figur 2 und die entsprechende Legende; Beispiele 1c, 1d in Verbindung mit Figur 4 und Figur 8).

Da der unabhängige Anspruch 16 dieses Merkmal nicht enthält, entspricht er nicht dem Erfordernis des Artikels 6 PCT in Verbindung mit Regel 6.3 b) PCT, dass jeder unabhängige Anspruch alle technischen Merkmale enthalten muss, die für die Definition der Erfindung wesentlich sind.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Schritte
 - Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine Bindesequenz (A) eines Stranges der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine Bindesequenz C', die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C im wesentlichen komplementär ist, binden kann,
 - Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an die zwischen den Sequenzen A und C gelegene Sequenz B oder das Komplement davon binden kann, und
 - Nachweis der Bildung eines Hybrides aus einem Amplifikat und der Sonde, dadurch gekennzeichnet, daß die zwischen den Bindesequenzen A und C gelegene Sequenz keine Nukleotide enthält, die nicht dem aus der Bindesequenz D der Sonde und der hiervon gebundenen Sequenz des Amplifikats gebildeten Sequenzbereich E zugehören und das Amplifikat kürzer als 100 Nukleotide ist.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindesequenz D der Sonde mit einer oder beiden Bindesequenzen der Primer überlappt.
3. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer an seinem nicht verlängerbaren Teil Nukleotide aufweist, die nicht direkt mit der nachzuweisenden Nukleinsäure oder ihrem Komplement hybridisieren.
4. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Bindesequenzen nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist.

5. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Gesamtlänge des Amplifikats kürzer als 60 Nukleotide ist.
6. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer immobilisierbar und die Sonde nachweisbar markiert ist.
7. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nachweisbar und die Sonde immobilisierbar markiert oder immobilisiert ist.
8. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde sowohl durch einen Fluoreszenzquencher als auch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist.
9. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß einer der Primer durch eine erste Energietransferkomponente und die Sonde durch eine zweite, davon verschiedene Energietransferkomponente markiert ist.
10. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikat durch physikalische und/oder spektroskopische Methoden detektiert wird.
11. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß zwei der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch sind.

13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde nicht spezifisch ist für die nachzuweisende Nukleinsäure.
14. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der Amplifikation jeweils zu A, G, C und T komplementäre Nukleotide eingesetzt werden.
15. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der Amplifikate mittels Massenspektroskopie erfolgt.
16. Verfahren zum spezifischen Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Schritte
 - Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe mindestens zweier Primer,
 - Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde, welche an das Amplifikat binden kann, und
 - Nachweis der Bildung eines Hybrides aus dem Amplifikat und der Sonde,dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nicht für die Gruppe von Organismen spezifisch ist, der der nachzuweisende Organismus angehört, die Gesamtlänge des Amplifikats kürzer als 100 Nukleotide ist und der Bereich des Amplifikats, der nicht von den Primern und der Sonde abgedeckt ist, eine Länge von 0 bis 3 Nukleotiden aufweist.
17. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zwei der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch sind.
18. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde nicht spezifisch ist für die nachzuweisende Nukleinsäure.

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

RECEIVED

SEP 10 2001

TECH CENTER 1600/2900

5610

09/530929

Applicant's or agent's file reference 4817/00/WO-Kn	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP98/06951	International filing date (day/month/year) 03 November 1998 (03.11.98)	Priority date (day/month/year) 04 November 1997 (04.11.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68		
Applicant ROCHE DIAGNOSTICS GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 3 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 09 March 1999 (09.03.99)	Date of completion of this report 26 January 2000 (26.01.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/06951

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1 - 45, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.

☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 1 - 18, filed with the letter of 10 January 2000 (10.01.2000),
Nos. _____, filed with the letter of _____.

☒ the drawings, sheets/fig 1/7 - 7/7, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☒ the claims, Nos. 19

☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☒ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

See Supplemental Box

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

Box I, § 1:

The sequence listing on pages 1-3 was submitted on the filing date and is therefore considered to be part of the description (PCT Rule 13ter.1(f))

Box I, § 3:

Independent Claim 16 and the claims which are dependent on it do not satisfy the requirements of PCT Article 34(2)(b).

The following features have been added to Claim 16:

1. "the total length of the amplificate is less than 100 nucleotides".

In the original application, the feature whereby the length of the amplificate is less than 100 base pairs only appears in connection with methods in which the probe is hybridised with the entire amplified sequence located between the primers. This feature does not appear in Claim 16, which therefore covers general PCR methods with an amplificate length of less than 100 base pairs. However, such methods were not disclosed in the original application.

Figure 4/7 does show an amplificate which is shorter than 100 nucleotides, and oligonucleotides (Fig. 4/7, second, fourth and penultimate lines) which do not hybridise in the entire range situated between the primers.

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

However, this can not provide a basis for the amended claims: apart from a general reference on page 12, Figure 4/7 does not appear to be mentioned anywhere in the description, and it is therefore unclear whether the oligonucleotides that are mentioned were actually used as probes in an experiment covered by the present application. Contrary to the opinion expressed by the applicants, the MPF2 probe does not appear to have been used in any of the experiments described in the present application.

Furthermore, throughout the description the "invention" is defined by the fact that the probe hybridises with the entire amplified sequence situated between the primers (cf. page 20, line 25, to bottom of page 22; Figure 2/7 and the corresponding key; Examples 1c and 1d in connection with Figures 4 and 8; and page 23, lines 1-10). Thus, the amended version of Claim 16 contradicts the entire teaching of the application.

2. "... the part of the amplificate which is not covered by the primers and probe has a length of 0 to 3 nucleotides".

This feature likewise contravenes PCT Article 34(2)(b), since there is no basis for generalising the three individual values shown in Figure 4/7 (the non-covered part of the amplificate has a length of 0, 1 or 3 nucleotides) to make a range of values.

Consequently, the examination has been performed on the

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 98/06951

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

basis of the original versions of Claims 16-18 and the amended versions of Claims 1-15.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 98/06951

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-15	YES
	Claims	16-18	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-15	YES
	Claims	16-18	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-18	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The following documents are referred to in the present opinion:

D1 WO-A-91/10675
D2 US-A-5 527 898

a) Claims 16-18

D1 describes the detection of papilloma virus genotypes using PCR. Non-specific primers capable of recognising a broad range of HPV genotypes are used (cf. page 10, lines 28-32; page 14), and non-specific probes are used for detection (cf. page 12, lines 14-17 and the Examples). The suggested primer pairs are GP5 and GP6, or GP1 and GP2. The length of each of these nucleotides is 20 nucleotides. Alternative primers have additional sequences (e.g. with restriction cleavage sites) on their 5' terminal (cf. Claim 5, for example).

The method involves the following steps (cf. pages 14-15):

- PCR with GP5 and GP6 (which correspond to the primers that bind to A and C' in the present application);
- agarose gel electrophoresis and blotting of the PCT products;
- hybridisation of the amplicates with a non-specific

probe. This is a GP5/GP6-controlled HPV-specific PCR amplificate, which is marked with ^{32}P . Thus, the probe binds to the entire range situated between the primers, and also to the bonding sequence of the two primers.

The subject matter of Claims 16-18 can therefore not be considered novel in the light of D1 (PCT Article 33(2)).

D2 describes a method similar to D1. The detection of HPV by PCR is performed using consensus primers. Long generic probes allow for non-type-specific detection (cf. abstract). The long generic probes cover the entire HPV genomic sequence lying between the HPV amplification primers, but not the sequences corresponding to the primer regions.

The following steps are carried out:

- amplification of the HPV sequences using L1 consensus primers MY09 and MY11;
- detection of the amplification products by hybridisation with the generic long HPV probes.

Both the probes and the primers can be ^{32}P -marked or biotinised (cf. passages cited in the search report).

Thus, D2 discloses all of the technical features of Claims 16-18, which cannot therefore be considered novel (PCT Article 33(2)).

b) Claims 1-15

Claim 1 concerns a method for identifying nucleic acids which is based on a PCR reaction and subsequent hybridisation with a probe. The method is characterised in that the probe hybridises with the entire amplified

sequence lying between the primers, and in that the amplificate is shorter than 100 nucleotides.

D1 and D2 show similar methods; in D1, the amplificate is 140 nucleotides in length (cf. pages 19-20, for example), and in D2 the probes alone (without including the primer sequences) are longer than 100 nucleotides, and normally 100-600 nucleotides long (cf. column 8). Taking into account an average primer length of 20 nucleotides, the length of the amplificate in D2 is 140-640 nucleotides.

Claim 1 is therefore novel (PCT Article 33(2)).

By shortening the amplificate, the advantages described in the application on page 36, line 11, to page 37, line 24, are gained.

It seems that a person skilled in the art would have had no cause to shorten the amplificate, since none of the documents cited in the search report contains any indication prompting him to do so. Moreover, the documents cited by the applicants (PCR Primer, A Laboratory Manual, CSHL Press 1995, ISBN 0-87969-448-3, pages 133-142; Nucleic Acid Research, Vol. 18, 1990, 6409-6412) confirm the view that amplificates of 120-250bp in length should be used for diagnostic methods and that the yield of the synthesised amplificates rises with lengths of 135bp to 5kbp.

Thus, a person skilled in the art would have been deterred from using a method as per Claim 1.

Claims 2-15 are dependent on Claim 1 and therefore likewise satisfy the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

- a) Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), neither the relevant prior art disclosed in D1-D2, nor those documents themselves, are mentioned in the description.
- b) In certain cases, the phrase "the disclosure of these applications is expressly referred to" will have to be deleted on entry into the national or regional phase (cf. PCT Guidelines for Preliminary Examination, Ch. II, 4.18, for example).

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The examining authority maintains its finding that the following feature is essential to the invention:

The probe must hybridise with the entire amplified sequence situated between the primers.

The applicants argue that only the shortening of the amplificate to a total length not exceeding 100 base pairs is essential to the invention. The examining authority rejects that view, because throughout the description the "invention" is defined by reference to the above-mentioned feature (cf. page 20, line 25, to the bottom of page 22; Figure 2 and the corresponding key; Examples 1c and 1d in connection with Figures 4 and 8).

Since independent Claim 16 does not contain that feature, it does not satisfy the requirements of PCT Article 6 in conjunction with PCT Rule 6.3(b), whereby each independent claim must contain all technical features that are essential to the definition of the invention.

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/24606
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. Mai 1999 (20.05.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06951		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 3. November 1998 (03.11.98)			
(30) Prioritätsdaten: 197 48 690.8 4. November 1997 (04.11.97) DE 198 14 001.0 28. März 1998 (28.03.98) DE 198 14 828.3 2. April 1998 (02.04.98) DE		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KESSLER, Christoph [DE/DE]; Schlossbergweg 11, D-82057 Icking (DE). HABERHAUSEN, Gerd [DE/DE]; Jochbergweg 2, D-82393 Iffeldorf (DE). BARTL, Knut [DE/DE]; Am Westend 6, D-82407 Wielenbach (DE). ORUM, Henrik [DK/DK]; Vildrosevej 3, DK-3500 Vaerlose (DK).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).			
(54) Title: SPECIFIC AND SENSITIVE NUCLEIC ACID DETECTION METHOD			
(54) Bezeichnung: SPEZIFISCHES UND SENSITIVES NUKLEINSÄURENACHWEISVERFAHREN			
(57) Abstract <p>The invention relates to a method for detecting a nucleic acid in which a plurality of amplicates of a section of the nucleic acid is produced with the aid of two primers. One primer can bond on a bonding sequence A of the nucleic acid, and the other can bond on a bonding sequence C' which is complimentary to a sequence C, does not overlap with A, and is placed in a 3'-direction of A. The amplicates are brought into contact with a probe having a bonding sequence D which can bond on a sequence B or the complement thereof, said sequence B and the complement thereof being placed between sequences A and C. The formation of a hybrid out of the amplicate and the probe is detected, whereby the sequence placed between bonding sequences A and C contains no nucleotides which do not belong to the bonding sequence D or complement D' thereof of the probe.</p>			
(57) Zusammenfassung <p>Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine Bindesequenz A der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine Bindesequenz C', die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C komplementär ist, binden kann, Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an eine zwischen den Sequenzen A und C gelegene Sequenz B oder das Komplement davon binden kann, und Nachweis der Bildung eines Hybrides aus dem Amplifikat und der Sonde, wobei die zwischen den Bindesequenzen A und C gelegene Sequenz keine Nukleotide enthält, die nicht der Bindesequenz D der Sonde oder ihrem Komplement D' zugehören.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Spezifisches und sensitives Nukleinsäurenachweisverfahren

- 5 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, bei dem eine Amplifikation eines Teilstückes dieser Nukleinsäuren vorgenommen wird und wobei dieses Teilstück im Hinblick auf seine Basensequenz bestimmte Bedingungen erfüllen muß, sowie ein Reagenzkit enthaltend zwei Primer und eine Sonde, die dieses Teilstück definieren.
- 10 Eine der meist angewandten molekularbiologischen Techniken zum Nachweis von Nukleinsäuren ist Hybridisierung mit sequenzspezifischen Sonden zum Nachweis homologer Nukleinsäure-Sequenzen. Der Nachweis von Nukleinsäure-Sequenzen ist von Bedeutung im Grundlagenbereich, jedoch von besonderer Bedeutung in verschiedenen Anwendungsfeldern, z. B. in den Bereichen medizinische Diagnostik,
- 15 forensische Diagnostik, Lebensmitteldiagnostik, Umweltdiagnostik, Pflanzenschutz und Tiermedizin.

- Als Sonde werden dabei entweder Oligonukleotide (kurze DNA oder RNA) oder Polynukleotide (längere DNA oder RNA) verwendet. Dabei haben die kürzeren Sonden gegenüber den längeren Sonden den Vorteil größerer Sequenzselektivität, wegen des
- 20 kürzeren Hybridisierungsbereichs aber den Nachteil geringerer Sensitivität. Eine verbesserte Sensitivität und Sequenzselektivität wird mit PNA-Sonden (Peptidnukleinsäuren, z. B. WO 92/20702) erreicht, da diese Sonden eine höhere Bindungsaffinität zu Nukleinsäuren haben (höherer T_m) und durch eine höhere Basendiskriminierung gekennzeichnet sind (ΔT_m). Zusätzlich können Sonden zum Nukleinsäure-Nachweis
- 25 Markierungsgruppen tragen, die entweder zum Fangen und/oder zur Detektion von Hybridkomplexen aus Sonde und nachzuweisender Nukleinsäure geeignet sind.

Zum Nukleinsäure-Nachweis durch Hybridisierung werden eine oder mehrere Sonden entweder zur Hybridisierung in Lösung oder auf festen Trägern verwendet. Bei Nukleinsäure-Nachweisen in Lösung spricht man von homogenen Nachweisformaten, bei Nachweis auf festen Trägern und/oder vermittelt durch feste Trägern von heterogenen Nachweisformaten. Bei den heterogenen Nachweisverfahren (z. B. dot blot) kann die nachzuweisende Nukleinsäure auf dem festen Träger vorgebunden sein. Die Hybridisierung erfolgt durch Inkontaktbringen mit einer Lösung, die die Sonde enthält. Umgekehrt kann die Sonde auf dem festen Träger vorgebunden sein (z. B. reverse dot blot). Die Hybridisierung erfolgt durch Inkontaktbringen der gebundenen Sonde mit einer Lösung, welche die nachzuweisende Nukleinsäure enthält. Bei homogenen Testformaten werden z. B. Sondenpaare verwendet, die endständig energieübertragende Gruppen tragen und die über Co-Hybridisierung an die nachzuweisende Nukleinsäure in unmittelbaren Kontakt gebracht werden und dadurch ein Signal erzeugen.

Der Nachweis von Nukleinsäuren durch alleinige Sonden-Hybridisierung hat nur begrenzte Sensitivität. So ist selbst mit empfindlichen Detektions-Markierungsgruppen wie ^{32}P , Digoxigenin, Biotin, Fluorescein, Ruthenium-Chelate, Fluorescein, Rhodamin oder AMCA allein nur eine Sensitivität in pg- bis fg-Bereich möglich. Zum empfindlichen Nukleinsäure-Nachweis gerade im medizinisch-diagnostischen Bereich sind jedoch Sensitivitäten im ag-Bereich und eine hohe Nachweisspezifität notwendig. Dies gilt sowohl für den Nachweis von körperfremden Nukleinsäuren, z. B. in Form von Infektionserregern, als auch für den Nachweis der An- oder Abwesenheit oder Veränderung körpereigener Nukleinsäuren. Hohe Nachweissensitivität und Nachweisspezifität ist aber auch in den anderen genannten Anwendungsbereichen von hoher Wichtigkeit.

So müssen manche Infektionserreger, wie z. B. HCV, HIV und HBV schon in wenigen Kopien nachgewiesen werden, um rechtzeitig erfolgreiche medizinische Interventionsmaßnahmen, z. B. durch frühzeitige Arzneimittelbehandlung, ansetzen zu können. Für solch frühzeitige Nachweise von Infektionserregern ist der Nachweis von Nukleinsäure-Sequenzen der Infektionserreger von Vorteil, da wegen der Verfügbarkeit von Nukleinsäure-Vervielfältigungstechniken (Nukleinsäure-Vermehrungsverfahren) ein empfindli-

- cher Nachweis schon in einer frühen Infektionsphase (Latenzphase) möglich ist. Die Möglichkeit der gezielten Vermehrung des nachzuweisenden Agens gibt es nur im Fall von Nukleinsäuren, nicht aber im Fall von immunologischen Nachweisverfahren. Bei diesen Verfahren ist eine Steigerung der nachzuweisenden Infektionserreger-spezifischen Partikel nur über die humorale Immunantwort über Bildung von
- 5 entsprechenden Infektionserreger-spezifischen Antikörpern möglich; diese Immunantwort erfolgt jedoch erst nach Ablauf der Latenzzeit und ist eine Sekundärreaktion nach Infektion durch den Erreger. Daher hat der Nachweis über Nukleinsäure-Hybridisierung den Vorteil, daß z. B. der Infektionserreger direkt nach
- 10 Infektion und sehr empfindlich nachgewiesen werden kann.

- Der Erfolg von medizinischen Interventionsmaßnahmen ist jedoch auch davon abhängig, daß der Infektionserreger nicht nur frühzeitig mit hoher Sensitivität, sondern auch sehr spezifisch nachgewiesen werden kann. Zur gezielten Behandlung ist daher eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Infektionserregern sowie die
- 15 Unterscheidung einzelner Subtypen oder Varianten wie, z. B. HIV-1 und HIV-2 oder z. B. HBV, HCV und HGV, von Bedeutung. Dabei ist aber auch entscheidend, daß quantitative Aussagen gemacht werden können und keine falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnisse erhalten werden, da solche falschen Ergebnisse u.U. gravierende therapeutische Konsequenzen nach sich ziehen können. Dies setzt Richtigkeit und hohe
- 20 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse voraus. Daher muß der Nukleinsäure-Nachweis nicht nur sehr sensitiv, sondern auch sehr spezifisch und reproduzierbar sein. Der spezifische und sensitive Nukleinsäure-Nachweis muß auch rasch erfolgen, damit eine gezielte Therapie umgehend erfolgen kann.

- Oftmals ist auch von Bedeutung, mehrere Infektionserreger wie z. B. HCV, HIV und
- 25 HBV nebeneinander nachzuweisen, z. B. im Rahmen von Blutbanken-Screeningtests. Dies erfolgt bei derzeit gängigen Nukleinsäure-Nachweistests durch hintereinandergeschaltete Einzelbestimmungen der nachzuweisenden Infektionserreger. Dies hat den Nachteil, daß mehrere Bestimmungen hintereinander durchgeführt werden müssen, was gerade beim Screening von großen Specimen-Stückzahlen nachteilig ist. Im Rahmen

dieser Nukleinsäure-Bestimmungen ist wünschenswert, sensitive und spezifische Testmöglichkeiten verfügbar zu haben, die z. B. eine rasche parallele Bestimmung mehrerer Infektionserreger nebeneinander in einer einzigen Probe ermöglichen (Multiplex-Bestimmung).

- 5 Beim Nachweis der An- oder Abwesenheit von körpereigener Nukleinsäure innerhalb bestimmter genomischer Loci und/oder deren Veränderungen, wie z. B. ererbte, spontane oder eine Mischung aus ererbten und spontanen Mutationen, Deletionen, Inversionen, Translokationen, Rearrangements oder Triplet-Expansionsen in Form von spezifischen und/oder polymorphen Veränderungen, ist ebenfalls die Verfügbarkeit
- 10 spezifischer und sensitiver Nukleinsäure-Nachweisverfahren von Vorteil. Die Verfügbarkeit spezifischer und sensitiver Nukleinsäure-Nachweisverfahren ist jedoch auch in den anderen genannten Anwendungsbereichen von hoher Wichtigkeit.

Die bisherigen Testverfahren zum sensitiven und spezifischen Nachweis der An- oder Abwesenheit von Nukleinsäuren basieren auf der kombinierten Durchführung von

- 15 Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen (Nukleinsäure-Vermehrung) und Nukleinsäure-Nachweisreaktionen (Detektion).

Die nachzuweisende Nukleinsäure wird dabei in einer für die Vermehrungsreaktionen zugänglichen Form eingesetzt, z. B. in Form von unbehandeltem oder behandeltem Probenmaterial und/oder Probenmaterial-Konzentrierung, z. B. durch Adsorption des

20 unbehandelten oder behandelten Probenmaterials an die Oberfläche eines festen Trägers und anschließende Resorption von diesem festen Träger. Solche festen Träger sind z. B. feste Träger mit glashaltigen Oberflächen. Durch diese festen Träger erfolgt keine substantielle Reinigung und/oder Isolierung der nachzuweisenden Nukleinsäuren, sondern lediglich eine Probenmaterial-Konzentrierung und ggf. Inaktivierung und/oder

25 Eliminierung von Inhibitoren für die darauffolgenden Nukleinsäure-Vermehrungs- und Nachweisreaktionen. Durch diese festen Träger ist auch die Bereitstellung mehrerer nachzuweisender Nukleinsäuren, z. B. im Rahmen von Multiplex-Verfahren, in für die Nukleinsäure-Vermehrungs- und -Nachweis-Reaktionen zugänglichen Form möglich.

- Andere Probenvorbereitungs-Verfahren enthalten gezielte Verfahrensschritte zur Nukleinsäure-spezifischen und/oder sequenzspezifischen Bindung der nachzuweisenden Nukleinsäure, z. B. die Verwendung von festen Trägern mit Nukleinsäure-spezifischen Bindungsgruppen und/oder Nukleinsäure-Fangsonden zur selektiven Bindung und
- 5 Freisetzung der nachzuweisenden Nukleinsäure durch Nukleinsäure-spezifische Bindung und anschließende Dissoziation zwischen Bindungsgruppe und/oder trägergebundener Fangsonde und nachzuweisender Nukleinsäure. Bei dieser Art von festen Trägern sind Nukleinsäure-spezifische Bindungsgruppen und/oder Nukleinsäure-Fangsonden an der Oberfläche der festen Träger notwendig. Daher sind zur
- 10 Bereitstellung mehrerer nachzuweisender Nukleinsäuren, z. B. im Rahmen von Multiplex-Verfahren, entweder mehrere feste Träger notwendig, was aufwendiger ist, oder feste Träger mit einer oder mehreren Bindungsgruppen und/oder mit multiplen oder mehreren Fangsonden. Multiple Fangsonden enthalten mehrere Bindungssequenzen für mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren. Diese Träger mit
- 15 mehreren Bindungsgruppen und/oder mehreren und/oder multiplen Fangsonden sind jedoch aufwendiger herzustellen. Ebenfalls sind die Reaktionsbedingungen zur gezielten Bindung mehrerer nachzuweisender Nukleinsäuren an Träger mit mehreren Bindungsgruppen und/oder Fangsonden schwieriger einzustellen bzw. die Bindung mehrerer nachzuweisender Nukleinsäurearten an eine Nukleinsäure-spezifische
- 20 Bindungsgruppe oder an eine Fangsonde mit mehreren komplementären Hybridisierungssequenzen schwieriger einzustellen.

- Die Vermehrung und der Nachweis der bereitgestellten nachzuweisenden Nukleinsäuren erfolgt in heterogenen oder homogenen Nukleinsäure-Vermehrungs-Nachweisformaten. Die Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen und Detektionreaktionen können entweder
- 25 hintereinander (heterogene Testverfahren) oder gleichzeitig (homogene Testverfahren) erfolgen. Als Vermehrungsreaktionen werden entweder targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen, targetabhängige Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen oder Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen verwendet. Die Verwendung von Detektionssystemen zum Nachweis der vermehrten Nukleinsäuren erfolgt entweder über
- 30 den Einbau von Nukleotiden und/oder die Verwendung von markierten Primern oder

markierten Sonden. Die verwendeten Detektionssysteme enthalten entweder direkte oder indirekte Detektionsmarkierungen bzw. gekoppelte sekundäre und tertiäre Nachweiskomponenten. Die Detektion der vermehrten nachzuweisenden Nukleinsäuren kann jedoch auch durch spektroskopische oder physikalische Methoden erfolgen.

- 5 Die bisherigen Nukleinsäure-Vermehrungs-Nachweisverfahren mit integrierten Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen haben den Nachteil geringer Sensitivität wegen der nicht-exponentiellen Signalvermehrung, erhöhten Störanfälligkeit durch stärkere Tendenz zur Hintergrundsignalbildung durch die Vielzahl der Sondenkomponenten und der Bildung unspezifischer Detektionssignale, da nicht die nachzuweisende
- 10 Nukleinsäure selbst, sondern lediglich ein daran gekoppeltes Detektionssignal target-unabhängig vermehrt wird. Beispiele sind gekoppelte Signalkaskaden (z. B. SELF-Zyklus) oder signalgebende Sonden-Baum- oder -Bürstenstrukturen (z. B. branched DNA).

- Die bisherigen Nukleinsäure-Vermehrungs-Nachweisverfahren mit integrierten target-
- 15 abhängigen Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen sind wegen der exponentiellen Signalvermehrung zwar sensitiver als die reinen Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsverfahren, haben aber wiederum den Nachteil der Bildung unspezifischer Detektionssignale, da nicht die nachzuweisende Nukleinsäure selbst, sondern lediglich ein davon in einer einleitenden targetabhängigen Primärreaktion abgeleitetes
- 20 Detektionssignal in Form eines Nukleinsäure-Reportermoleküls Targetsequenz-unabhängig enzymatisch vermehrt wird. Beispiele sind die Q β -Replikationsreaktion, bei der ein Q β -Reportermolekül enzymatisch vermehrt wird, oder die Ligase-Kettenreaktion, bei der Teilstücke der Nukleinsäure-Reportermoleküle sequenzunabhängig enzymatisch verknüpft werden.

- 25 Als Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte der bisher sensitivsten und spezifischsten exponentiellen targetspezifischen Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen wie z. B. PCR (US-A-4,683,202 bzw EP-B-0 202 362), RT-PCR, NASBA (EP-A-0 329 822) oder TAM, wurden bisher jeweils einzel- oder doppelsträngige Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte durch targetsequenzabhängige thermostatische oder isotherme enzymatische

Elongation gegenläufige Primer, die sequenzspezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure sind und an die Enden der Nukleinsäure-Vermehrungseinheit (Amplikon) der nachzuweisenden Desoxyribo- oder Ribo-Nukleinsäuren oder deren Komplemente binden und somit die Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte begrenzen, erzeugt. Bei diesen Elongationsreaktionen werden alle 4 Basenspezifitäten eingebaut.

Die genannten Nukleinsäure-Vermehrungs-Nachweisverfahren mit integrierter target-spezifischer Nukleinsäure-Vermehrungsreaktion sind wegen Targetsequenz-abhängiger enzymatischer Nukleinsäure-Vermehrungszyklen am spezifischsten. Während lineare targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen, wie z. B. die Cycling-Probe-Reaktion, nur zu begrenzter Sensitivität führen, ergeben exponentielle targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen wie Elongations-basierte Reaktionen wie z. B. die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, RT-PCR) oder Transkriptions-basierte Reaktionen wie z. B. Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) oder Transcription Mediated Amplification (TMA) bisher die sensitivsten und spezifischsten Signale.

Mischformen zwischen targetabhängiger Signal-Nukleinsäure-Vermehrung und target-spezifischer Nukleinsäure-Vermehrung, wie z. B. die Gap-filling Ligase-Kettenreaktion (gap-filling LCR, WO 90/01069), haben zwar gegenüber der nicht-modifizierten LCR einen targetabhängigen Reaktionsschritt, dieser ist aber begrenzt auf limitierte Sequenzabschnitte bestehend aus lediglich 1 oder 2 Basenspezifitäten und damit limitierterer Target-Spezifität.

Für den Nachweis der entstandenen Nukleinsäure stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Der Nachweis der gebildeten Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte über Fragment- oder Sequenz-Gelanalyse ist zeitaufwendig und nicht quantitativ. Der Nachweis über trägergebundene Dot-, Slot- oder Reverse-Dot-Blot-Verfahren ist ebenfalls zeitaufwendig und nicht quantitativ.

Quantitative sensitive und spezifische Bestimmungen der nachzuweisenden Nukleinsäuren wurden bisher im Rahmen von heterogenen oder homogenen targetspezifischen exponentiellen Nukleinsäure-Vermehrungs-Reaktionsformaten möglich, bei denen das

Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt entweder durch eingebaute Label oder durch Hybridisierung mit einer für die nachzuweisende Nukleinsäure oder deren Komplement spezifischen Sonde in einem Teil des durch Elongation entstandenen Sequenzabschnitts abgefangen wird. Exponentielle Nukleinsäure-Vermehrungs-Reaktionsformate, bei
5 denen eine Interkalation von Nukleinsäure-bindenden Farbstoffen erfolgt, sind zwar auch sensitiv, aber nicht sequenzspezifisch.

Bei den heterogenen Reaktionsformaten wird das Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt z. B. entweder über eine Primer-Fangmodifikation oder durch eine immobilisierte Fangsonde, die komplementär zu einem internen Sequenzabschnitt des Nukleinsäure-
10 Vermehrungsprodukts ist, auf einen festen Träger gebunden und über Einbau eines detektionsmarkierten Nukleotids, durch Hybridisierung mit einer detektionsmarkierten Sonde, die komplementär zu einem internen Sequenzabschnitt des Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts ist, oder über eine Primer-Detektionsmodifikation nachgewiesen. In homogenen Reaktionsformaten erfolgte bisher der Nachweis z. B. über die
15 Hybridisierung einer Sonde, die komplementär zu einem internen Sequenzabschnitt des Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts ist und die einen gequenchten Fluoreszenz-Label trägt, wobei die Targetsequenz-abhängige enzymatische Aufhebung der Quenchung durch die Primer-Elongationsbedingte Freisetzung des gequenchten Fluoreszenz-markierten Nukleotids erfolgt (WO92/02638).

20 Bei allen bisherigen quantitativen sensitiven und spezifischen heterogenen und homogenen targetspezifischen exponentiellen Nukleinsäure-Vermehrungs-Reaktionsformaten wurden bisher Nukleinsäure-Vermehrungseinheiten (Amplikons) verwendet, die neben den spezifischen Primer- und Sonden-Bindungssequenzen zusätzliche Sequenzen variabler Länge zwischen den flankierenden Primer-Bindungssequenzen und der
25 internen Sonden-Bindungssequenz enthielten. Diese fünfgeteilte Amplikonsstruktur resultierte in Amplikonlängen größer als die Summe der Sequenzlängen der beiden flankierenden Primer und der internen Sonde zwischen vorzugsweise 100 und 1000 Basen(paaren). Optimierungen der Nukleinsäure-Vermehrungsreaktion durch

verbesserte Enzymmischungen gingen bisher vielmehr hauptsächlich in Richtung längere Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte.

Kürzere Amplikonlängen wurden bisher lediglich zum Nachweis spezieller Sequenzen wie z. B. bei Triplet-Expansionen, für In-situ-Untersuchungen oder den Nachweis stark fragmentierter Nukleinsäuren im Rahmen der Altertumsforschung erzeugt. Diese kurzen Amplikon-Längen wurden jedoch in zeitaufwendigeren Gelformaten oder In-situ-Formaten detektiert, die durch mangelnde Sensitivität und/oder fehlende Quantifizierung gekennzeichnet sind. Andere spezielle kurze Sequenzen wie Short Tandem Repeats, Short Interspersed Repetitive Elements Microsatellite Sequences oder HLA-spezifische Sequenzen wurden bisher lediglich als Primer- oder Sonden-Bindungssequenzen verwendet.

Die fünfgeteilten Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte haben den Nachteil, daß sie neben den spezifisch Primer und Sonde bindenden Sequenzen noch zusätzliche Sequenzen beinhalten, die das Amplikon verlängern und die Gesamtspezifität im Hinblick auf die Spezifitäts-generierenden Primer- und Sonden-Bindungsreaktionen reduzieren.

Die bisher verwendeten längeren fünfteiligen Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte haben ferner den Nachteil längerer Primer-Elongationszeiten und damit längere Gesamt-Testzeiten. Die Sensitivität ist auch begrenzt durch Plateaueffekte der beteiligten Enzyme und Substrate, die bei längeren Amplikons früher erreicht werden. Ein weiterer Nachteil längerer Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte ist eine Konkurrenz zwischen Amplikon-Gegenstrang und Detektor- oder Fangsonde und somit reduzierter Sensitivität. Ein weiterer Nachteil ist die erhöhte Möglichkeit der unspezifischen Bindung bedingt durch die zusätzlichen Sequenzen mit der Folge eines erhöhten Hintergrunds und dadurch geringerer Sensitivität (geringeres Signal-Rausch-Verhältnis). Ein weiterer Nachteil bei der Bindung des Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts an trägergebundene Fangsonden ist die sterische und kinetische Hinderung längerer Nukleinsäure-Moleküle; daher werden Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte bisheriger Länge vor der Bindung durch die Fangsonde

vorzugsweise fragmentiert. Ein weiterer Nachteil ist die erhöhte Anfälligkeit gegenüber Fragmentierung innerhalb der Amplikonsequenz und dadurch Zerstörung der Nukleinsäure-Vermehrungseinheit; dies führt zu geringerer Reproduzierbarkeit. Ein weiterer Nachteil ist, daß längere Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte bei niedrigen

5 Testtemperaturen von z. B. 37 °C, die bei gängigen Nukleinsäure-Analysegeräten vorgegeben sind, weniger spezifisch hybridisieren, da eine größere Differenz zur Schmelztemperatur besteht. Ein weiterer Nachteil von fünfteiligen Nukleinsäure-Vermehrungsprodukten ist beim Nachweis mehrerer verschiedener Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte, daß unterschiedliche Nukleinsäure-Vermehrungslängen gebildet

10 werden, die einen Multiplex-Nachweis erschweren.

Ziel der vorliegenden Erfindung war es, ein alternatives Nachweisverfahren für Nukleinsäuren bereitzustellen, welches Vorteile gegenüber den bisher beschriebenen Verfahren hat.

Eine spezielle Aufgabe der Erfindung bestand darin, ein targetabhängiges exponentielles

15 Nukleinsäure-Vermehrungsverfahren zum hochsensitiven, hochspezifischen, reproduzierbaren und quantifizierbaren Nachweis einer oder mehrerer einzelsträngiger oder doppelsträngiger Nukleinsäuren bereitzustellen, welches insbesondere einen oder mehrere der genannten Nachteile vermeidet.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung war, unter Erhalt der Gesamtspezifität die Auswahl

20 der Primer- und SONDENSEQUENZEN so flexibel zu gestalten, daß eine Bestimmung mehrerer verschiedener nachzuweisender Nukleinsäuren in einem vereinheitlichten Reaktionsformat unter Verwendung von teilweise gleichen Primer- oder SONDENSEQUENZEN möglich ist.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer Vielzahl von Amplifi-

25 katen eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine erste Bindesequenz (A) eines Strangs der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine zweite Bindesequenz (C'), die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C dieses Stranges im wesentlichen komplementär

ist, binden kann, Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an die zwischen den Sequenzen A und C gelegene dritte Sequenz (B) oder das Komplement (B') davon binden kann, und Nachweis der Bildung eines Hybrides aus einem Amplifikat und der Sonde, dadurch gekennzeichnet, daß die zwischen
5 den Bindesequenzen A und C gelegene dritte Sequenz (B) oder das Komplement (B') davon keine Nukleotide enthält, die nicht dem aus der Bindesequenz D der Sonde und der hieran gebundenen Sequenz des Amplifikats gebildeten Sequenzbereich E zugehören. Bevorzugt ist die Länge der Sonde gleich groß oder größer als die Sequenz B oder das Komplement B'.

- 10 Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenzkit zur Durchführung dieses Verfahrens.

In Fig. 1 ist schematisch die in der vorliegenden Beschreibung verwendete Bezeichnungsweise für die Bereiche auf der nachzuweisenden Nukleinsäure gezeigt.

- In Fig. 2 ist die entsprechende Bezeichnungsweise für die intermediär gebildeten
15 Verlängerungsprodukte der Primer sowie die Amplifikate (Amplikons) gezeigt. Ebenfalls ist gezeigt, daß die Amplifikate ein oder mehrere weitere Bereiche Y aufweisen können, die außerhalb des Bereiches liegen, der die von der nachzuweisenden Nukleinsäure stammende Sequenzinformation enthält.

- In Fig. 3 ist schematisch gezeigt, wie im Falle der vorliegenden Erfindung die Bindesequenzen der Primer und Sonde angeordnet sind. Es ergeben sich verschiedene
20 Alternativen I bis VI, je nachdem, ob und wie die Bindesequenzen überlappen. Es ist jeweils nur ein Strang des Amplifikats gezeigt. Dieselbe Anordnung (nur komplementär) kann für einen zweiten Strang des Amplifikats erstellt werden. Für die intermediär gebildeten Verlängerungsprodukte ergibt sich ein ähnliches Bild. Als Fall V
25 und VI ist der Fall gezeigt, daß die Sonde neben der Bindesequenz D noch weitere, nicht mit dem Amplifikat Basenpaarungen ausbildende Bereiche X enthält, die gleich oder verschieden sein können. Zum Vergleich ist der Fall des Standes der Technik als VII gezeigt.

In Fig. 4 sind Sequenzen der benutzten Bereiche eingezeichnet, nämlich A', B und C.

In Fig. 5 sind weitere bevorzugte Primer und Sonden gezeigt. Dabei ist insbesondere die Kombination mit der Sonde aus Zeile 3 bevorzugt.

In Fig. 6 und 7 sind auch noch Primer und Sonden gezeigt, die entweder unspezifisch
5 sind oder bei denen keine Nukleotide zwischen Primer und Sonde übrig sind.

In Fig. 8 ist ein besonders kurzes Stück HCV-Genom gezeigt, mit dessen Hilfe kurze Amplicons hergestellt werden können.

Nukleinsäuren, welche mit dem erfindungsgemäßen Verfahren nachgewiesen werden können, können beliebigen Ursprungs sein, beispielsweise Nukleinsäuren viroiden,
10 viralen, bakteriellen oder zellulären Ursprungs. Proben (specimen), in denen die nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen oder deren Komplement enthalten sind, sind z. B. humane, tierische, bakterielle oder pflanzliche Flüssigkeiten, Exkremente, Abstriche, Zellsuspensionen, Kulturen oder Gewebs-, Zell- oder Flüssigkeits-Punktionen. Bevorzugt liegen die Nukleinsäuren in Lösung vor. Damit das erfindungsgemäße Verfahren
15 seine Vorteile voll entfalten kann, hat es sich als zweckmäßig erwiesen, wenn die nachzuweisende Nukleinsäure eine Größe von mindestens 40 bp aufweist. Die Nukleinsäure kann auch eine durch Klonierung und in-vivo-Vermehrung hergestellte Nukleinsäure sein.

Die nachzuweisende Nukleinsäure kann einzelsträngig (insbesondere bei RNA) oder
20 ganz oder teilweise doppelsträngig (insbesondere bei DNA) sein. Für den Fall doppelsträngiger Nukleinsäuren können beide Stränge vermehrt werden oder aber auch nur einer. Aus beiden Sorten von Nukleinsäuren können einzel- oder doppelsträngige Amplifikate gebildet werden, wovon einer oder beide zum weiteren Nachweis verwendet werden können. Entsprechend wird die Sequenz der Sonde oder der Sonden
25 ausgewählt. Sie ist bevorzugt komplementär zu dem Strang des Amplifikats, der zum weiteren Nachweis verwendet wird.

Der Probe oder einer Kontrollprobe können positive oder negative Kontrollnukleinsäuren oder Quantifizierungsstandards zugesetzt sein, die ähnlich oder gleich behandelt werden wie die nachzuweisenden Nukleinsäuren (interner bzw. externer Standard, interne bzw. externe Kontrolle). Als Standards können beispielsweise interne oder
5 externe heterologe DNA- oder RNA-Standards, enthaltend zu den Sequenzen der nachzuweisenden Nukleinsäuren homologe Primer-Bindesequenzen und zu Sequenzen der nachzuweisenden Nukleinsäure heterologen Sonden-Bindesequenzen, verwendet werden. Umgekehrt ist aber auch die Verwendung von besonders im 3'-Priming-Bereich heterologen Primer-Bindesequenzen und homologen Sonden-Bindesequenzen
10 möglich. Als Negativ-Kontrollen werden bevorzugt analoge Specimen eingesetzt, welche die nachzuweisenden Nukleinsäuren oder deren Komplement nicht enthalten.

Vor der Vermehrung wird die Probe bevorzugt einem oder mehreren Vorbehandlungsschritten unterzogen, um die nachzuweisenden Nukleinsäuren in eine vermehrungsfähige Form zu bringen. In einem ersten optionalen Schritt findet eine
15 Vorbehandlung der Probe (Specimen) statt, durch welche die Probe in eine Form gebracht wird, aus der die nachzuweisende Nukleinsäure in eine für die Überführung der vorbehandelten Probe in eine für die Vermehrung geeignete Form gebracht wird (z. B. eine Abtrennung störender Bestandteile aus der Probe).

Die Art der Vorbehandlung der Probe hängt von der Art der Probe und der Komplexität
20 des biologischen Materials in der Probe ab. Bei humanen Körperflüssigkeiten, wie z. B. Human-Blut, erfolgt in einer bevorzugten Ausführungsform zunächst eine Abtrennung von Blutzellen zur Erzeugung von Plasma, Serum oder Blutzellkonzentraten. Durch diesen Trennschritt wird durch die Probenvorbehandlung die Komplexität des biologischen Probenmaterials in den resultierenden Fraktionen deutlich reduziert, ohne daß
25 eine substantielle Isolierung der nachzuweisenden Nukleinsäure erfolgt. Im Fall von Sputum oder Abstrichen erfolgt eine Probenvorbehandlung z. B. durch Suspendieren des Sputums bzw. des Abstrichs in einer Flüssigkeit, im Fall von Urin z. B. durch Zentrifugation und Weiterverarbeitung der erhaltenen Fraktionen. Im Fall von Gewebspunktionen erfolgt eine Probenvorbehandlung z. B. durch Suspendierung und

Behandlung mit einem Zellverbands-auflösenden Agens. Bei Cerebrosidal-Flüssigkeit erfolgt die Probenvorbehandlung z. B. durch Zentrifugation und Weiterverarbeitung der erhaltenen Fraktionen. Auch in diesen Fällen erfolgt durch die Probenvorbehandlung eine Reduktion der Komplexität des biologischen Probenmaterials.

- 5 Danach kann sich ein Schritt anschließen, in dem die nachzuweisende Nukleinsäure aus der vorbehandelten Probe in eine für die Vermehrung zugängliche Form überführt wird. Dabei werden bevorzugt bekannte Methoden angewandt. In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt in einem ersten Reaktionsschritt eine Lysebehandlung der vorbehandelten Probe zur Freisetzung der nachzuweisenden Nukleinsäure, z. B. durch Proteinase
- 10 K-Behandlung bei erhöhten Temperaturen oder bei Desoxyribonukleinsäuren durch Alkali. In einem zweiten Schritt wird die durch Lyse vorbehandelte Probe nach Zugabe von chaotropen Agentien, wie z. B. Guanidinium-Hydrochlorid oder Harnstoff, in An- oder Abwesenheit von löslichen Alkoholen, wie z. B. Isopropanol, an die Oberfläche eines festen Trägers und anschließende Resorption von diesem festen Träger konzen-
- 15 triert. Solche festen Träger sind z. B. feste Träger mit glashaltigen Oberflächen (z. B. Magnetpartikel, Glasvliese mit glashaltigen Oberflächen, Partikel, Mikrotiterplatten, Reaktionsgefäße, Dip-sticks oder miniaturisierte Reaktionskammern, die wiederum auch Teil von integrierten Reaktionschips sein können). Durch diesen festen Träger erfolgt bevorzugt eine nicht-sequenzspezifische Reinigung, d.h. keine substantielle
- 20 Isolierung der nachzuweisenden Nukleinsäuren von anderen Nukleinsäuren, sondern lediglich eine Probenmaterial-(Nukleinsäuren-)Konzentrierung und ggf. Inaktivierung und/oder Eliminierung von Inhibitoren für die darauffolgenden Nukleinsäure-
- 25 Vermehrungs- und Nachweisreaktionen. Durch diese festen Träger ist auch die Bereitstellung mehrerer nachzuweisender Nukleinsäure, z. B. im Rahmen von
- 25 Multiplex-Verfahren, in für die Nukleinsäure-Vermehrungs- und -Nachweis-Reaktionen zugängliche Form möglich.

In einer anderen Ausführung kann die Überführung der nachzuweisenden Nukleinsäure aus der vorbehandelten Probe nach Nukleinsäure-Freisetzung in einem ersten Schritt durch z. B. Proteinase K-Behandlung bei erhöhten Temperaturen oder bei Desoxyribo-

- nukleinsäuren durch Alkali erfolgen. In einem zweiten Schritt wird die lysierte vorbehandelte Probe zur Bindung der nachzuweisenden Nukleinsäure mit festen Trägern in Kontakt gebracht, die mit Nukleinsäure-spezifischen Bindungsgruppen und/oder Fangsonden spezifisch zur selektiven Bindung der nachzuweisenden
- 5 Nukleinsäure modifiziert sind, und anschließend die gebundene nachzuweisende Nukleinsäure durch Dissoziation zwischen Bindungsgruppe und/oder trägergebundener Fangsonde und nachzuweisender Nukleinsäure wieder eluiert. Beispiele für Nukleinsäure-spezifische Bindungsgruppen sind PNA-Homopyrimidin-Oligomere wie z. B. (T)₇-PNA oder Nukleinsäure-bindende niedermolekulare Substanzen wie z. B.
- 10 Nukleinsäure-Interkalatoren, Major groove-Binder oder Minor groove-Binder. Beispiele für Fangsonden spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure sind Nukleinsäure-Oligomere oder Nukleinsäure-Polymere mit Bindungssequenzen für eine oder mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren. Weitere Beispiele für Fangsonden spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure sind PNA-Oligomere mit Bindungssequenzen für eine
- 15 oder mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren. Die Bindung der Nukleinsäure-spezifischen Bindungsgruppen oder der Fangsonden an den festen Träger kann mit oder ohne Zwischenschaltung von Abstandhaltern (Spacern) entweder kovalent oder über Bindungspaare, wie z. B. Biotin:Streptavidin oder Ni:Chelat, erfolgen.

- Die zur Vermehrung eingesetzten Nukleinsäuresequenzen können linear oder zirkulär
- 20 sein und können Sequenz-Modifikationen und/oder sonstige Modifikationen, wie z. B. natürliche oder artifizielle Nukleotidanaloga oder Äquivalente davon oder Basen-Analoga oder Äquivalente davon, enthalten oder methyliert, gecappt, polyadenyliert oder in sonstiger Weise modifiziert sein. Die zur Vermehrung eingesetzten Nukleinsäuren oder deren Komplement können natürlichen Ursprungs sein,
- 25 fragmentiert, modifiziert oder enzymatisch, z. B. mit dem Enzym Uracil-Deglykosylase (UNG), oder physikalisch vorbehandelt, vorvermehrt, oder chemisch, photochemisch oder enzymatisch erzeugt sein, z. B. durch chemische Oligonukleotidsynthese oder in-vitro-Replikation, in-vitro-Reverse Transkription oder in-vitro-Transkription.

In dem ersten essentiellen Verfahrensschritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein Teilstück der nachzuweisenden Nukleinsäure amplifiziert. Im folgenden wird dieses Teilstück auch Amplikon genannt. Dieses enthält zwingend den Sequenzbereich zwischen den äußeren Enden der Bindesequenzen A und C' bzw. des Komplements davon der Primer, und enthält den Bindebereich E der Sonde bzw. das Komplement davon. Gemäß der vorliegenden Erfindung ist das Amplikon (bevorzugt die Gesamtlänge der Sequenzen der Bereiche A, B und C) bevorzugt kürzer als 100 Nukleotide, besonders bevorzugt kürzer als 60 Nukleotide, jedoch bevorzugt länger als 40 Nukleotide. Dies bedeutet jedoch nicht, daß die Gesamtlänge der Amplifikate nicht doch größer sein kann, z. B. wenn die Primer zusätzlich Nukleotide aufweisen. Es werden solche Vermehrungsmethoden eingesetzt, die eine Vermehrung der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz oder deren Komplement erlauben, die in der Bildung von Tripartite-Mini-Nukleinsäure-Vermehrungsprodukten münden. Hierfür stehen prinzipiell alle Nukleinsäureamplifikationsverfahren zur Verfügung, die im Stand der Technik bekannt sind. Bevorzugt werden targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen verwendet. Besonders bevorzugt werden theoretisch exponentielle targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen verwendet, bei denen eine antiparallele Replikation der nachzuweisenden Nukleinsäure oder deren Komplement erfolgt, wie z. B. Elongations-basierte Reaktionen wie z. B. die Polymerase-Kettenreaktion (PCR für Desoxyribonukleinsäuren, RT-PCR für Ribonukleinsäuren) oder Transkriptions-basierte Reaktionen wie z. B. Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) oder Transcription Mediated Amplification (TMA). In besonderer Weise bevorzugt werden thermozyklische exponentielle Elongations-basierte Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen wie z. B. die Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Die zur Vermehrung eingesetzten nachzuweisenden Nukleinsäuren oder deren Komplement können in Form von einzelsträngigen oder doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäuren oder Ribonukleinsäuren vorliegen. Ziel der Vermehrungsreaktion (Amplifikation) ist die Herstellung einer Vielzahl von Amplikaten eines Teilstücks der nachzuweisenden Nukleinsäure. Unter einem Amplikat wird daher jede unter Verwendung von Sequenzinformation der

Nukleinsäure hergestellte Molekülspezies verstanden. Insbesondere handelt es sich um Nukleinsäuren. Der Begriff "Amplifikat" beinhaltet sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Nukleinsäuren. Ein Amplifikat kann neben den die Sequenzinformationen der zugrunde liegenden Nukleinsäure enthaltenden Bereichen (Amplikon) außerhalb der voneinander wegweisenden Enden der Primerbindungsstellen noch weitere Bereiche enthalten, welche nicht in direkter Relation mit Sequenzen der zu amplifizierenden Nukleinsäure stehen. Bevorzugt kommen gerade solche Sequenzen einer Länge von mehr als 15 Nukleotiden nicht auf der nachzuweisenden Nukleinsäure oder ihrem Komplement vor und können mit dieser nicht durch direkte Basenpaarung hybridisieren. Amplifikate können somit entweder mit der nachzuweisenden Nukleinsäure selbst oder mit deren Komplement hybridisieren. Amplifikate sind beispielsweise auch die Produkte einer asymmetrischen Amplifikation, d. h. einer Amplifikation, bei der die beiden Stränge in unterschiedlicher Menge gebildet werden (z. B. durch Einsatz unterschiedlicher Mengen an Primern) oder einer der beiden Stränge wieder zerstört wird (z. B. durch RNase).

Unter einem Primer im Sinne der vorliegenden Erfindung wird ein Molekül verstanden, welches über Basenpaarungen an eine Nukleinsäure binden kann und welches, bevorzugt enzymatisch, verlängert werden kann. Bevorzugt sind Oligonukleotide, die an ihrem 3'-Ende unter Verwendung der nachzuweisenden Nukleinsäure oder einem Komplement hiervon als Templatnukleinsäure verlängert werden können. Als Primer können monovalente oder multivalente oder monofunktionelle oder multifunktionelle Agentien eingesetzt werden, die eine Nukleinsäure-abhängige Elongation zulassen. Bevorzugt können als Primer Oligomere oder Polymere einer Bindelänge von zwischen 9 und 30 nt verwendet werden, die an die nachzuweisende Nukleinsäure antiparallel binden und die als einer von mehreren Reaktionspartnern für eine enzymatische Replikation der nachzuweisenden Nukleinsäure oder deren Komplement wirken. Besonders bevorzugt werden als Primer Oligomere verwendet, die nach Zugabe eines Vermehrungsreagenzes durch Anlagerung zumindest eines Teils des Primers an die nachzuweisende Nukleinsäure oder deren Komplement eine gerichtete Replikation einer oder beider Stränge der nachzuweisenden Nukleinsäure oder deren Komplement

initiierten. Ein Beispiel für einen besonders bevorzugten Primer ist ein Oligonukleotid mit einem freien 3'-Hydroxyl-Ende.

- Die als Primer eingesetzten Agentien können eine oder mehrere Bindesequenzen für eine oder mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren oder deren Komplement enthalten
- 5 und können Sequenz-Modifikationen, endständige und/oder interne Sequenzergänzungen und/oder sonstige Modifikationen wie z. B. natürliche oder artifizielle Nukleotidanaloga oder Äquivalente davon, nicht funktionelle Nukleotidanaloga oder Äquivalente davon oder Basen-Analoga oder Äquivalente davon enthalten oder methyliert, gecappt oder polyadenyliert oder in sonstiger Weise
- 10 modifiziert sein. Erforderlich ist, daß sie die geforderten Bindeeigenschaften zur nachzuweisenden Nukleinsäure bzw. ihrem Komplement haben und verlängerbar sind. Bevorzugte Nukleotid-Äquivalente sind PNA-Monomere bzw. PNA-Oligomere (WO92/20702) mit oder ohne positive und/oder negative Ladungen im Rückgrat und/oder im Abstandshalter. Die als Primer eingesetzten Agentien können
- 15 Modifikationen tragen, die entweder direkt oder indirekt über ein weiteres Bindungspaar zur Detektion und/oder Bindung an einen festen Träger geeignet sind. Bevorzugte Primer-Modifikationen sind die Fluoreszenzfarbstoffe wie z. B. Fluorescein, Rhodamin, AMCA oder Derivate davon, einen der Partner in einem der Bindungspaare Biotin:(Strept-)Avidin, Digoxigenin:Anti-Digoxigenin, Digoxigenin:Anti-Digoxigenin
- 20 gekoppelt mit Äquorin, Fluorescein: Anti-Fluorescein oder Ruthenium- oder Rhenium-Chelat oder Äquorin. Eine besonders bevorzugte Primer-Modifikation ist Biotin als Fang- oder Detektions-Modifikation. Die Primer können weitere Sequenzbereiche Y enthalten, insbesondere an ihrem 5'-Ende (Fig. 2). Hier sind sowohl 5'-3'-Verknüpfungen als auch 5'-5'-Verknüpfungen und/oder 5'-2'-Verknüpfungen möglich.
- 25 Außerdem können sie zusätzliche Strukturkomponenten, wie z. B. Abstandshalter, immobilisierbare Gruppen oder Löslichkeits-vermittelnde Molekülteile oder im Hinblick auf Primingaktivität aktivierbare Bereiche haben, wie z. B. AP-Stellen.

Unter einer Sonde wird ein Molekül verstanden, welches aufgrund von Basen-Basen-Wechselwirkungen mit Nukleinsäuren hybridisieren kann. Bevorzugte Sonden sind

daher Oligonukleotide sowie basenhaltige Nukleinsäuremimetica, wie Peptidnukleinsäuren (PNA). Die Länge einer Sonde beträgt, bezogen auf die Bindesequenz D, bevorzugt zwischen 9 und 30 Basen.

PNA-Oligomer-Sonden mit oder ohne positive oder negative Ladungen im Rückgrat und/ oder Abstandshalter haben die zusätzlichen Vorteile, daß sie stabil sind gegenüber dem Abbau von Nukleasen oder Proteasen wegen der verschiedenen Struktur des Rückgrats und der H- bzw. NH₂-Enden, einen höheren Schmelzpunkt in Bindungskomplexen zwischen Nukleinsäuren und PNA als zwischen zwei Nukleinsäure-Molekülen aufwiesen und der Hybridkomplex dadurch stabiler ist, bei niedrigen Salzkonzentrationen anwendbar sind, eine höhere Differenz der Schmelzpunkte bei Fehlpaarungen aufwiesen und somit eine bessere Fehlpaarungs-Diskriminierung möglich ist, Sequenzen mit Sekundärstrukturen bei niedrigen Salzkonzentrationen zugänglicher sind, die Konkurrenz zwischen Amplikon-Gegenstrang und Sonde geringer ist bei niedrigen Salzkonzentrationen und dadurch eine höhere Signalausbeute erreicht wird und das Potential zur Eliminierung des Amplikon-Denaturierungsschritts bei niedrigen Salzkonzentrationen besteht.

Als Sonden können monovalente oder multivalente Agentien eingesetzt werden, die eine Bindung vermehrungsabhängiger Elongationsprodukte und/oder vermehrter Nukleinsäuresequenzen zulassen. Bevorzugt können als Sonden Oligomere oder Polymere verwendet werden, die an die nachzuweisende Nukleinsäure antiparallel binden. Besonders bevorzugt werden als Sonden Oligomere verwendet, die durch Anlagerung zumindest eines Teils der Sonde an die nachzuweisende Nukleinsäure oder deren Komplement eine im Rahmen der Folgereaktionen stabile Bindung an einen oder beide Stränge der nachzuweisenden Nukleinsäure oder deren Komplement herbeiführen. Die Oligomere können sowohl 5'-3'-Verknüpfungen als auch 5'-5'-Verknüpfungen und/oder 5'-2'-Verknüpfungen sowie zusätzliche Strukturkomponenten, wie z. B. Abstandshalter oder Löslichkeits-vermittelnde Molekülteile, enthalten.

Unter einer Bindesequenz wird bevorzugt die Sequenz von Basen verstanden, die zwischen den äußersten, mit einer bestimmten Nukleinsäure, einem Primer oder einer Sonde über Basen-Basen-Wechselwirkung bindenden Basen einer bestimmten Nukleinsäure, einem Primer oder einer Sonde liegt, einschließlich dieser äußersten Basen.

- 5 Die als Sonde eingesetzten Agentien können eine oder mehrere Bindesequenzen D für eine oder mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren oder deren Komplement, insbesondere jedoch für einen Strang des Amplifikats enthalten und können Sequenz-Modifikationen, endständige und/oder interne Sequenzergänzungen und/oder sonstige Modifikationen wie z. B. natürliche oder artifizielle Nukleotidanaloga oder Äquivalente
- 10 davon, nicht funktionelle Nukleotidanaloga oder Äquivalente davon oder Basen-Analoga oder Äquivalente davon enthalten oder methyliert, gecappt oder polyadenyliert oder in sonstiger Weise modifiziert sein, solange die Bindung an einen Strang des Amplifikats möglich ist. Bevorzugte Nukleotid-Äquivalente sind PNA-Monomere bzw. PNA-Oligomere mit oder ohne positive und/oder negative Ladungen im Rückgrat
- 15 und/oder Abstandshalter. Die als Sonden eingesetzten Agentien können Modifikationen tragen, die entweder direkt oder indirekt über ein weiteres Bindungspaar zur Detektion und/oder Bindung an einen festen Träger geeignet sind. Bevorzugte Sonden-Modifikationen (nachweisbare Gruppen I, immobilisierbare Gruppen I) sind die Fluoreszenzfarbstoffe wie z. B. Fluorescein, Rhodamin, AMCA oder Derivate davon,
- 20 Bindungspaare Biotin:(Strept-)Avidin, Digoxigenin:Anti-Digoxigenin, Digoxigenin:Anti-Digoxigenin gekoppelt mit Äquorin, Fluorescein:Anti-Fluorescein oder Ruthenium-Chelat oder Äquorin. Besonders bevorzugte Sonden-Modifikation sind Biotin als Fang- oder Detektions-Modifikation, Digoxigenin, Ruthenium- oder Ruthenium-Chelat oder Äquorin als Detektions-Modifikationen.
- 25 In der vorliegenden Erfindung wird das Teilstück der Nukleinsäure, von welchem eine Vielzahl von Amplifikaten hergestellt werden soll, so ausgewählt, daß es drei Bereiche A, B und C enthält. Die Bereiche A und C sind Bereiche, die so gewählt werden, daß einer der Primer die Sequenz A als Bindesequenz benutzen kann und das Komplement des Bereiches C als Bindesequenz für den anderen Primer dienen kann. Unter einem

Komplement wird im Sinne der vorliegenden Erfindung eine zu einer bestimmten anderen Nukleinsäure, z. B. einem Sequenzbereich z. B. eines Amplifikats oder der nachzuweisenden Nukleinsäure im wesentlichen komplementäre Nukleinsäure oder Nukleinsäuresequenz verstanden.

- 5 Im wesentlichen komplementär bedeutet, daß die Basenpaarungen so gewählt sind, daß (für den Fall, daß eine Hybridisierung mit einer anderen Nukleinsäure, z. B. einer Sonde oder einem Primer) eine Hybridisierung unter den Testbedingungen noch erfolgen kann bzw. (für den Fall eines Verlängerungsprodukts eines Primers im Verhältnis zu dem eingesetzten Templat) die Nukleinsäure aufgrund einer Primerverlängerungsreaktion
10 unter Verwendung der entsprechenden Nukleinsäure gebildet werden konnte. Im wesentlichen komplementär bedeutet daher oft, daß unter stringenten Bedingungen mehr als 90 % der Basen der betrachteten Nukleinsäure bzw. Sequenz mit der bestimmten Nukleinsäure bzw. Sequenz Basenpaarungen ausbilden.

- Die Bereiche A und C sind erfindungsgemäß bevorzugt so lang, daß Bedingungen
15 gefunden werden können, bei denen Primer einer entsprechenden Länge mit den Basen in diesen Bereichen hybridisieren können. Daher sind die Bereiche bevorzugt länger als 8, besonders bevorzugt länger als 12 Nukleotide. Auch bezüglich der Obergrenze der Länge der Bereiche A und C ergeben sich im Sinne der Erfindung bevorzugte Bereiche. Die Bereiche A und C sind jeweils bevorzugt kleiner als 30, besonders bevorzugt
20 kleiner als 20 Nukleotide. Die Länge der Bereiche wird in einem besonderen Aspekt der Erfindung dadurch nach oben begrenzt, daß die Primer in für die nachzuweisende Nukleinsäure unspezifischer Weise daran hybridisieren können sollen. Daher ist die besonders bevorzugte Länge der Bindesequenzen A und C 12 bis 20 Nukleotide. Die Bereiche A und C auf der nachzuweisenden Nukleinsäure überlappen nicht miteinander.

- 25 Im Sinne der Erfindung enthalten das Teilstück der nachzuweisenden Nukleinsäure (welches dem Amplikon entspricht) und somit die hieraus gebildeten Amplifikate eine zwischen den Bereichen A und C gelegene Sequenz B (Fig. 1 bis 3). Diese Sequenz hat eine Länge von ein oder mehr Nukleotiden, bevorzugt mehr als 4, besonders bevorzugt mehr als 8 Nukleotide. Nach oben hin ist die Länge der Sequenz B durch die geforderte

Nichtanwesenheit von Nukleotiden, die nicht der Bindesequenz der Sonde zugehören, und in einem besonderen Aspekt der Erfindung durch die gewünschte Unspezifität der Sonde begrenzt. Besonders bevorzugt ist die Sequenz B daher kleiner als 30, besonders bevorzugt kleiner als 15 Nukleotide. Die Sequenz B hat bevorzugt eine Länge von
5 zwischen 4 und 15 Nukleotiden. Diese Sequenz oder das Komplement davon dienen im Sinne der Erfindung mit zur Bindung der Sonde. Die Länge der Sonde wird so gewählt, daß eine Hybridisierung mit dem Amplifikat möglich ist. Die Sequenz der Sonde wird so gewählt, daß sie eine Bindesequenz D enthält, welche durch die mit dem Amplikon Basen-Basen-Wechselwirkung ausbildenden Nukleotide der Sonde, insbesondere den
10 zwischen den äußersten mit korrespondierenden Basen des Amplikons Basenwechselwirkung ausbildenden Nukleotide der Sonde definiert ist. Bevorzugt ist die Sonde im wesentlichen komplementär zu den Nukleotiden der Bindesequenz E des Amplifikats. Die Bindesequenz D bzw. deren Komplement D' kann zu dem Amplifikat zu 100 % komplementär sein, aber auch Mismatches (Fehlpaarungen) zwischen den äußeren Enden
15 der Bindesequenz aufweisen. Die Sonde kann neben der Bindesequenz weitere Gruppen oder Reste oder auch Nukleinsäure-bindende Bereiche enthalten (Fig. 3, V, VI).

Abhängig von der Länge des Bereiches B und der Länge der Bindesequenz D bzw. D' lassen sich unterschiedliche Fallgestaltungen treffen. In einem ersten Fall ist die Bindesequenz D oder D' länger als der Bereich B bzw. B' des Amplikons. In diesem Fall
20 reicht die Bindesequenz D bzw. D' in einen oder beide Bereiche A bzw. A' und C bzw. C' des Amplikons hinein. Diese Fälle sind in Fig. 3, II bis IV gezeigt. In diesen Fällen enthält das Amplifikat zwischen den voneinander wegweisenden Enden der Bereiche A und C keine Nukleotide, die nicht der Bindesequenz E oder den Bindesequenzen der Primer zugehören. Die Bindesequenz D der Sonde überlappt in Fig. 3, II und III mit
25 einer der beiden Bindesequenzen der Primer.

In einem weiteren Fall entspricht die Länge des Bereiches B der Länge des Bereiches D, so daß die Bindesequenz der Sonde nicht mit den Bindesequenzen der Primer überlappt (Fig. 3, I).

Das erfindungsgemäße Verfahren beinhaltet in einer bevorzugten Ausführungsform die Bildung von dreiteiligen Mini-Amplikons (Tripartite-Mini-Amplikon), die neben den Primer und Sonde bindenden Sequenzen keine zusätzlichen Sequenzen aufweisen und somit die Nachteile bei Bildung von längeren Nukleinsäure-Vermehrungsprodukten vermeiden, wobei andererseits die Spezifität des gesamten Amplifikationsformats durch Bindung der Primer, durch Bindung der Sonde und durch Ablauf der targetabhängigen enzymatischen Elongationsreaktion mit allen 4 Nukleotid- bzw. Basenspezifitäten oder natürlicher oder artifizierlicher Analoga, Isomere oder Äquivalente davon aber sichergestellt wird. Das erfindungsgemäße Vermehrungsverfahren wird daher auch als Mini-Chain-Reaction (MCR) bezeichnet.

Die Vermehrung der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen oder deren Komplement erfolgt, wenn im folgenden nichts anderes ausgesagt ist, unter Befolgung der dem Fachmann bekannten Reaktionsschritte und Reaktionsbedingungen. Ein Unterschied zu den herkömmlichen Verfahren ist der Einsatz der speziell ausgewählten Primer und Sondensequenzen, welche die Bildung und Vermehrung des Mini-Tripartite-Amplikons erlauben. Wesentlich im Sinne der Erfindung ist die Zugabe eines oder mehrerer Primer, die an die Primer-Bindesequenzen der nachzuweisenden Nukleinsäure, des Tripartite-Mini-Amplikons beziehungsweise deren Komplemente binden.

Allgemein üblich ist die Zugabe zur Vermehrung befähigender Vermehrungsreagentien. Bevorzugt können als Vermehrungsreagentien enzymatisch aktive Komponenten (z. B. Enzyme) in Kombination mit Elongationssubstraten und geeignete Hilfsreagentien (wie Puffer) verwendet werden. Bevorzugte Elongationssubstrate sind Nukleinsäurebausteine oder natürliche oder artifizierliche Analoga oder Isomere oder Äquivalente davon. Als Elongationssubstrate werden Agentien eingesetzt, die zum Aufbau eines Gegenstrangs der nachzuweisenden Nukleinsäure in gegenläufiger Form geeignet sind. Bevorzugt werden als Elongationssubstrate Nukleotide eingesetzt. Bevorzugte Nukleotide sind dATP, dGTP, dCTP, dTTP und/oder dUTP, dITP, iso-dGTP, iso-dCTP, deaza-dGTP und ATP, GTP, CTP, UTP und/oder ITP, deazaGTP, iso-GTP, iso-CTP. Äquivalente sind PNA-Monomere bzw. PNA-Oligomere mit oder ohne

positive und/oder negative Ladung im Rückgrat und/ oder im Abstandshalter. Die Elongationssubstrate können, wie oben ausgeführt, Modifikationen tragen.

- Besonders bevorzugt werden im Fall der PCR als Nukleinsäure-Vermehrungsreagentien Mischungen aus meta- oder thermostabilen enzymatischen DNA-Polymerasen und
- 5 Mischungen von Desoxyribo- und/oder Ribonukleotiden und geeignete Hilfsreagenzien verwendet, z. B. Taq-DNA Polymerase in Kombination mit dATP, dGTP, dCTP, dTTP und/oder dUTP und Hilfsreagentien wie z. B. Salze und ggf. Detergentien. Besonders bevorzugt werden im Fall der RT-PCR als Vermehrungsreagentien Mischungen aus thermostabilen enzymatischen Reverse Transkriptase- und DNA-Polymerase-
- 10 Aktivitäten und Mischungen von Desoxyribo- und Ribonukleotiden und geeignete Hilfsreagentien verwendet, z. B. Mischungen aus AMV oder Mo-MLV-Reverse Transkriptase oder Tth-DNA Polymerase in Kombination mit dATP, dGTP, dCTP, dTTP und/oder dUTP und ATP, GTP, CTP, UTP und Hilfsreagentien wie z. B. Salze und ggf. Detergentien.
- 15 Bei den thermozyklischen Vermehrungsreaktionen (z. B. PCR, RT-PCR) werden 2- oder 3-phasige Zyklen durchgeführt, bevorzugt 2-phasige Zyklen. Bei den 2-phasigen Zyklen wird die Strangtrennung der Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte bei hoher Temperatur, bevorzugt 85 °C - 95 °C, durchgeführt, das gemeinsame Primer-Annealing und Primer-Elongation bei Temperaturen nahe dem Schmelzpunkt zwischen Primer und
- 20 Elongationsgegenstrang, bevorzugt zwischen 55 °C und 75 °C. Die Strangtrennung erfolgt durch Energiezufuhr und/oder enzymatisch, bevorzugt durch erhöhte Temperatur, Mikrowellen oder das Anlegen einer Spannung über eine Mikroelektrode, besonders bevorzugt durch erhöhte Temperatur. Es werden bis zu 60 Thermozyklen durchgeführt, bevorzugt 32 - 42. Bei den isothermen Vermehrungsreaktionen wird eine
- 25 kontinuierliche Inkubation bei einer mittleren Temperatur zwischen 30 °C und 70 °C durchgeführt, bevorzugt bei 37 °C - 45 °C mit Enzymmischungen bzw. 60 °C - 65 °C mit mesothermen Enzymmischungen. Es wird bis zu 2 Stunden inkubiert, bevorzugt 30 - 60 Minuten. Die Vermehrungsreaktion kann in Reaktionsgefäßen, Kapillaren oder

miniaturisierten Reaktionskammern erfolgen, die auch Teil eines integrierten Reaktionschips sein können.

Bei Verwendung von dUTP anstelle von oder in Ergänzung zu dTTP wird durch die DNA-Polymerase-Aktivität dUMP anstelle von dTMP in die vermehrte Nukleinsäuresequenz oder deren Komplement eingebaut. Dies erlaubt durch Inkubation mit der Enzymaktivität Uracil-Deglycosylase, bevorzugt mit einer thermolabilen Ausführungsform der Enzymaktivität, bei der die Renaturierung nach thermischer Denaturierung der Enzymaktivität langsamer erfolgt, die Fragmentierung des Vermehrungsprodukts und somit seiner Eigenschaft als Nukleinsäure-Vermehrungseinheit. Die Inkubation des UMP-haltigen Vermehrungsprodukts kann im Anschluß an die Nukleinsäure-Vermehrungs- und Nachweisreaktion (Sterilisierung) und/oder vor einer erneuten Nukleinsäure-Vermehrungsreaktion (Carry over-Prävention) erfolgen.

Alternativ können auch Psoralen und/oder Isopsoralen und Derivate davon und Bestrahlung mit UV-Licht zur funktionellen Inaktivierung des Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts verwendet werden.

Im Fall von NASBA und TMA können als Nukleinsäure-Vermehrungsreagentien bevorzugt Mischungen aus metastabilen enzymatischen Reverse Transkriptase-, DNA-Polymerase, RNase H und RNA-Polymerase und Mischungen von Desoxyribo- und Ribonukleotiden und geeignete Hilfsreagentien verwendet werden, z. B. eine Mischung aus AMV oder Mo-MLV-Reverse Transkriptase, ggf. E. coli DNA-Polymerase, ggf. E. coli RNase H und T7-, T3- oder SP6-codierte RNA-Polymerase oder Mo-MLV Reverse Transkriptase und T7-, T3- oder SP6-RNA-Polymerase oder entsprechende mesostabile Enzyme, z. B. aus Bacillus stearothermophilus in Kombination mit dATP, dGTP, dCTP, dTTP und/oder dUTP und ATP, GTP, CTP, UTP, und Hilfsreagentien wie z. B. Salze und ggf. Detergentien. Der Reaktionsverlauf der Vermehrungsreaktion bei NASBA, TMA ist isotherm.

Der Nachweis der Bildung der Amplifikate erfolgt mit der Sonde, die an die Bindesequenz B des Amplikons zu einem Hybrid bindet. Die Sonde kann als Fang- oder

Detektionssonde fungieren. Die Enden der Bindesequenz der Sonde liegen zwischen den äußeren Enden der Primer-Bindesequenzen. Die Sonde ist somit hybridisierbar mit einem Strang des Amplifikats.

Die Bindung der Sonde kann unter Benutzung bekannter Bedingungen geschehen. Denn
5 bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um eine spezielle Ausführungsform der sogenannten Hybridisierungstests, die in ihren Grundzügen dem Fachmann auf dem Gebiet der Nukleinsäurediagnostik bekannt sind. Soweit experimentelle Details im folgenden nicht ausgeführt sind, wird dazu vollinhaltlich auf "Nucleic acid hybridisation", Herausgeber B.D. Hames und S.J. Higgins, IRL Press, 1986, z. B. in den
10 Kapiteln 1 (Hybridisation Strategy), 3 (Quantitative Analysis of Solution Hybridisation) und 4 (Quantitative Filter Hybridisation), Current Protocols in Molecular Biology, Ed. F.M. Ausubel et al., J. Wiley and Son, 1987, und Molecular Cloning, Ed. J. Sambrook et al., CSH, 1989, Bezug genommen. Zu den bekannten Methoden gehört auch die
15 Auswahl von Hybridisierungsbedingungen, durch welche eine Spezifität erreicht werden kann, die vom Ausmaß der Homologie zwischen den zu hybridisierenden Nukleinsäuren, deren GC-Gehalt und deren Länge abhängt.

Hierzu wird, wenn die Fangsonde (in geschützter Form) nicht schon vorher zugegeben wurde, die Sonde zu der Reaktionsmischung nach der Vermehrungsreaktion, bevorzugt
20 in Form einer Lösung, zugegeben. Dabei werden Reagenzbedingungen eingestellt, die eine Hybridisierung der Sonde mit einem Amplifikat erlauben.

Die Bindung zwischen der vermehrten Nukleinsäuresequenz des Amplikons und/oder dessen Komplement und der Sonde erfolgt bevorzugt bei einer konstanten Temperatur zwischen 20 °C und 75 °C, bevorzugt um 0 °C - 30 °C, besonders bevorzugt um 0 °C -
25 15 °C unterhalb der Schmelztemperatur des Bindekomplexes. Die Inkubationszeit beträgt bis zu 4 Stunden, bevorzugt 15 - 120 Minuten, besonders bevorzugt 30 - 60 Minuten. Die Bindung mit dem Amplifikat und/oder dessen Komplement erfolgt mit oder ohne vorausgehenden Denaturierungsschritt. Die Reaktionsführung ohne vorausgehenden Denaturierungsschritt erfolgt bevorzugt mit PNA-Oligomeren mit oder

ohne negative und/oder positive Ladungen im Rückgrat und/oder im Abstandshalter bei niedrigen Salzkonzentrationen.

Bei Verwendung mehrerer Sonden oder multifunktionaler Sonden oder Sonden, die mehrere Bindesequenzen für Amplifikate verschiedener nachzuweisenden

- 5 Nukleinsäuren oder deren Komplemente aufweisen, können mehrere unterschiedliche Amplifikate oder deren Komplemente gebunden werden. Dabei erlaubt die Bildung von Tripartite-Mini-Amplikons bevorzugt ähnlicher Länge, besonders bevorzugt solcher Tripartite-Mini-Amplikons gleicher Länge, bei der Nukleinsäurevermehrung die Einstellung vereinheitlichter Inkubationsbedingungen für die Bildung der
- 10 unterschiedlichen Bindekomplexe. Dies erlaubt den parallelen und/oder sequentiellen Nachweis mehrerer Nukleinsäuresequenzen im Rahmen von Multiplex-Verfahren.

- Der Nachweis des gebildeten Bindekomplexes zwischen Amplifikat und Sonde kann in für den Fachmann bekannten Verfahren, insbesondere in verschiedenen Ausführungsformen erfolgen, nämlich direkten Nachweisverfahren, wie z. B. mit spektroskopischen
- 15 oder physikalischen Methoden, durch Sequenzierung oder durch heterogene oder homogene Nachweisformate.

- Direkte spektroskopische oder physikalische Verfahren sind z. B. Schmelztemperaturbestimmungen, Anlagerung von interkalierenden oder Nukleinsäure-bindenden Farbstoffen oder Metallatomen oder -partikeln, Massenspektroskopie, Oberflächen-
- 20 Plasmonenresonanz oder Fluoreszenz-gekoppelte Oberflächen-Plasmonenresonanz, oder E-wave-Messungen.

- Die Sequenzierung des gebundenen Tripartite-Mini-Amplikons kann über Bindung des Primers und anschließende enzymatische Sequenzierung nach Sanger erfolgen. Zur Detektion der Sequenzierungsprodukte ist bevorzugt entweder der Primer markiert oder
- 25 die Kettenabbruchreagentien. Die Sequenzierungsprodukte können auch über Massenspektroskopie nachgewiesen werden. Bei Zugabe lediglich limitierter Nukleotidarten entsprechend den flankierenden Nukleotiden am Primerende ist eine Minisequenzierung möglich, was besonders für die Analyse von Polymorphismen von Vorteil ist.

Bei den heterogenen Nachweisverfahren kann die Sonde abhängig von der angebrachten Modifikation entweder als Fangsonde oder als Detektorsonde verwendet werden. Bei Verwendung mehrerer Sonden sind Multiplexformate realisierbar.

Bei Verwendung der Sonde als Fangsonde kann die Sonde entweder an dem festen
5 Trägerkovalent oder über ein Bindungspaar vorgebunden sein und die Bildung des Bindekomplexes zwischen Amplifikat und der Sonde erfolgt auf dem festen Träger. Bei dieser Ausführungsform können neben festen Trägern, die eine Sondenart enthalten, auch feste Träger realisiert werden, die mehrere bzw. eine Vielzahl von Sondenarten enthalten, wie z. B. Sonden-Teststreifen, Sonden-Panels oder Sonden-Arrays auf festen
10 Trägern oder miniaturisierten Chips, die wiederum auch Teil von integrierten Reaktionschips sein können. Diese trägergebundenen Nachweissysteme sind besonders geeignet für Multiplexformate. In einer bevorzugten Ausführungsform wird der Komplex zwischen Amplifikat und Fangsonde in Lösung erst vorgebildet und anschließend auf den festen Träger aufgebracht. Hierzu enthält das Amplikon bevorzugt
15 eine immobilisierbare Gruppe I, die an eine an einer Festphase befindlichen Gruppe R binden kann.

Die Art der Festphase richtet sich nach der zur Immobilisierung befähigenden Gruppe I. Bevorzugt weist sie eine immobilisierende Gruppe R auf, die eine bindende Wechselwirkung mit I eingehen kann. Ist die immobilisierbare Gruppe beispielsweise ein
20 Hapten, dann kann eine Festphase verwendet werden, die an ihrer Oberfläche Antikörper gegen dieses Hapten aufweist. Ist die immobilisierbare Gruppe ein Vitamin, wie z. B. Biotin, dann kann die Festphase bindende Proteine wie Avidin oder Streptavidin immobilisiert enthalten. Besonders bevorzugte Reste I und R sind Biotin und Streptavidin. Die Immobilisierung über eine Gruppe an der modifizierten
25 Nukleinsäure ist besonders vorteilhaft, da sie unter milderen Bedingungen stattfinden kann als beispielsweise Hybridisierungsreaktionen. Bevorzugt wird zur Immobilisierung der gebildeten Nukleinsäuren die Reaktionsmischung vor, während oder nach Bildung der Nukleinsäurehybride in ein Gefäß gefüllt, welches an seiner Oberfläche mit der immobilisierbaren Gruppe reagieren kann. Es ist möglich, eine Festphase in Form eines

- porösen Materials, wie einer Membran, eines Gewebes oder eines Vlieses, zu verwenden, auf welche die Reaktionsmischung aufgegeben wird. Ebenso ist die Verwendung von Perlen, sogenannten beads - z. B. Magnetpartikeln oder Latex-Partikeln - möglich. Das Gefäß ist bevorzugt eine Küvette, ein Röhrchen oder eine
- 5 Mikrotiterplatte. Die feste Phase sollte mindestens so viele Bindungsstellen für die immobilisierbare Gruppe der Sonde haben wie Nukleinsäurehybride und damit nachzuweisende Nukleinsäuren vorhanden sind. Die Herstellung einer bevorzugten festen Phase ist in der EP-A- 0 344 578 beschrieben, auf welche vollinhaltlich Bezug genommen wird.
- 10 Für die heterogenen Nachweisreaktionen wird nach der Inkubationszeit, während der die Immobilisierungsreaktion stattfindet, die flüssige Phase aus dem Gefäß, dem porösen Material oder den pelletierten beads entfernt. Die Festphase kann anschließend mit einem geeigneten Puffer gewaschen werden, da die Bindung der Hybride an der Festphase sehr effizient ist. Die Detektion der gebundenen Bindekomplexe kann über
- 15 die während der Nukleinsäuresequenz-Vermehrungsreaktion eingebaute Detektionsmodifikation im Primer und/oder der Sonde und/oder einem Nukleotid mit Hilfe von bekannten direkten oder indirekten Nachweisarten für diese Modifikationen nach dem Stand der Technik erfolgen.
- Bei direkt nachweisbaren Gruppen, beispielsweise Fluoreszenzlabeln, kann die Menge
- 20 an Markierung fluorometrisch bestimmt werden. Ist die nachweisbare Gruppe indirekt nachweisbar z. B. ein Hapten, so wird die modifizierte Nukleinsäure bevorzugt mit einem markierten Antikörper gegen das Hapten umgesetzt, wie analog in der EP-A-0 324 474 beschrieben. Die Markierung am Antikörper kann beispielsweise eine Farb- oder Fluoreszenzmarkierung oder bevorzugt eine Enzymmarkierung, wie
- 25 β -Galactosidase, alkalische Phosphatase oder Peroxidase, sein. Im Falle der Enzymmarkierung wird die Menge an Nukleinsäure über die meist photometrische chemoluminometrische oder fluorometrische Verfolgung einer Reaktion des Enzyms mit einem chromogenen, chemoluminogenen oder fluorogenen Substrat gemessen. Das

Meßsignal ist ein Maß für die Menge ursprünglich vorhandener nachzuweisender Nukleinsäure und somit ggf. an nachzuweisenden Organismen.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die vermehrten Tripartite-Mini-Amplikons durch Nukleinsäure-Fangsonden oder PNA-Fangsonden gebunden, die
5 kovalent auf Mikrotiterplatten oder Magnetpartikeln immobilisiert sind. Die Detektion erfolgt in dieser bevorzugten Ausführungsform nach Bildung des Bindekomplexes und Waschen über eine Biotin-Modifikation eines oder beider Primer im Amplifikat durch Anlagerung von Avidin-Meerettich-Peroxydase und einer Mischung aus TMB/TMF-Farbsubstraten.

10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt der Einbau einer Digoxigenin-Detektionsmarkierung über eines der Nukleotide der Nukleinsäure-Vermehrungsreaktion. Der Bindekomplex zwischen Amplifikat und einer Biotin-markierten Nukleinsäure-Fangsonde oder PNA-Fangsonde wird auf die Oberfläche eines Streptavidin-beschichteten Reaktionsgefäßes gebunden. Nach Waschen erfolgt Anlage-
15 rung von Anti-Digoxigenin-Meerettich-Peroxidase-Antikörperkonjugaten und Farbnachweis mit dem Farbsubstrat ABTS.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt der Nachweis einer oder mehrerer Amplifikate nach Bindung durch eine oder mehrere verschiedene kovalent (z. B. Anthrachinon: UV-Licht-Kopplung oder Gold-Oberfläche: SH-Kopplung) oder koordinativ (z. B. Biotin: Streptavidin) gebundene Fangsonden, durch Waschen und durch
20 Detektion eines Fluoreszenz- oder Chemilumineszenz-Signals, das entweder direkt durch Primärlicht oder über Oberflächenplasmonresonanz oder E-wave angeregt wurde, mit Hilfe von CCD-Kameras oder konfokalen Fluoreszenz-Scannern.

Bei Verwendung der Sonde als Detektionssonde kann die Sonde entweder gleichzeitig,
25 vor oder nach Bindung des Amplifikats an die feste Phase binden. In diesem Fall erfolgt die Bindung des Amplifikats an die feste Phase über Modifikationen, die über einen oder beide Primer oder über die eingebauten Nukleotide eingebaut wurden. Anschließend wird gewaschen und detektiert.

In einer weiteren Ausführungsform wird der Komplex zwischen Amplifikat und Detektionssonde in Lösung erst vorgebildet und anschließend auf den festen Träger aufgebracht und gewaschen. Die Detektion der Festphase-gebundenen Bindekomplexe zwischen Amplifikat und Detektionssonde erfolgt über die Detektionsmodifikation der
5 Sonde mit Hilfe von bekannten direkten oder indirekten Nachweisarten für diese Modifikationen nach dem Stand der Technik.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden an die Amplifikate, die über einen oder beide Primer Biotin-Modifikationen enthalten, Ruthenium-Chelat-haltige Detektions-
10 sonden gebunden. Die Detektionssonden sind entweder Ruthenium-markierte Oligonukleotide oder Ruthenium-markierte PNA-Oligomere. Nach Bildung des Bindekomplexes zwischen Ruthenium-markierter Detektionssonde und Biotin-markiertem Amplifikat erfolgt Bindung des Komplexes an Streptavidin-beschichtete Magnetpartikel, Transfer in eine Meßzelle, Anlagerung an eine Elektrode innerhalb der Meßzelle und Erzeugung und Messung eines Elektrochemilumineszenz-Signals.

15 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Detektions-Sonde mit Digoxigenin markiert. Nach Bildung des Bindekomplexes zwischen Digoxigenin-markierter Detektionssonde und Biotin-markiertem Amplifikat erfolgt die Bindung des Komplexes durch eine Fangsonde, die kovalent auf einer Mikrotiterplatte oder auf Magnetpartikeln immobilisiert ist. Die Detektion erfolgt in dieser bevorzugten
20 Ausführungsform nach Bildung des Bindekomplexes und Waschen über eine Biotin-Modifikation eines oder beider Primer im Tripartite-Mini-Amplikon durch Anlagerung von Avidin-Meerrettich-Peroxidase und einer Mischung aus TMB/TMF-Farbsubstraten.

Bei der Verwendung von homogenen Reaktionsformaten werden Detektionssonden verwendet, die entweder gequenchte Fluoreszenzmarkierungen, interne
25 Basensubstitutionen mit Doppelstrang-Komplex-aktivierbaren Fluoreszenzfarbstoffen oder endständige Energie-Donatoren oder -Akzeptoren (in Kombination mit entsprechenden Energie-Donatoren oder -Akzeptoren an benachbarten Primerenden: Energy-Transfer-Komplexe) tragen. In diesen Fällen wird die Detektionssonde schon während der Nukleinsäure-Vermehrung zugegeben. Im Fall der gequenchten

- Fluoreszenzmarkierungen erfolgt eine Fluoreszenzaktivierung durch Dequenching nach Bindung der Detektions-Sonde an das entstehende Tripartite-Mini-Amplikon und exonukleolytischer Abbau und Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoff-modifizierten Nukleotids. Im Fall der internen Basensubstitutionen erfolgt die Erzeugung des
- 5 Fluoreszenzsignals durch Ausbildung des Bindekomplexes zwischen Detektionssonde und dem sich bildenden Tripartite-Mini-Amplikon. Im Fall der Energie-Transfer-Komplexe erfolgt die Bildung eines Fluoreszenzsignals durch benachbarte Anlagerung des markierten Primers und der markierten Sonde. Die Messung der resultierenden Fluoreszenzsignale erfolgt jeweils bevorzugt durch Real time-Messungen.
- 10 In einer besonderen Ausführungsform werden bei den gequenchten Detektorsonden Fluorescein und Rhodamin oder Derivate davon als Fluoreszenz- und Quencher-Komponenten verwendet. In einer weiteren Ausführungsform werden bei den gequenchten Detektorsonden Ruthenium- oder Rhenium-Chelate und Quinone oder Derivate davon als Elektrochemilumineszenz- und Quencher-Komponenten verwendet.
- 15 In einer weiteren besonderen Ausführungsform werden als interne Basensubstituenten der Detektorsonde Anthrachinon oder Derivate davon verwendet. In einer weiteren Ausführungsform werden Cy-5 und Fluorescein oder Derivate davon als Energie-Transfer-Komponenten verwendet. In einer speziellen Ausführungsform werden Cyanin-Farbstoffe wie z. B. SYBR Green oder Acridin-Farbstoffe verwendet.
- 20 Besonders bevorzugt im Sinne der Erfindung sind solche Ausführungsformen, bei denen mindestens eine der Bindesequenzen der Primer und der Sonde nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist. Spezifisch im Sinne der Erfindung ist eine Sequenz dann, wenn sie aufgrund einer fortlaufenden Sequenz von Nukleobasen prinzipiell in der Lage wäre, unter stringenten Bedingungen nur mit einer Sequenz auf
- 25 der nachzuweisenden Nukleinsäure, nicht jedoch mit Nukleinsäuren anderer, nicht nachzuweisender Organismen oder Spezies oder Gruppen von Organismen zu binden. Bevorzugt ist eine Sequenz dann nicht für eine Sequenz spezifisch, wenn sie unter den Bedingungen, welche für die Durchführung des Nachweises eingestellt werden, mit anderen Nukleinsäuren hybridisieren könnte.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum spezifischen Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Schritte Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe mindestens zweier Primer, Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde, welche an das Amplifikat binden kann, und Nachweis

5 der Bildung eines Hybrides aus dem Strang des Amplifikates und der Sonde, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist. In diesem Fall kann der Bereich B Nukleotide enthalten, welche nicht der Bindesequenz E zugehören. Auch hier sind jedoch Überlappungen der Bindesequenzen der Primer und der Sonde möglich.

- 10 Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenzkit zur Durchführung dieses Verfahrens.

- In einer weiteren Ausführungsform enthalten die Primer an ihrem 5'-Ende weitere Sequenzen, die sich im humanen Genom an die Primersequenzen anschließen. Diese Sequenzen sind zwischen 1 und 100, besonders bevorzugt zwischen 5 und 80
- 15 Nukleotide lang. Es ist möglich, einen oder beide der Primer entsprechend zu modifizieren. Die zusätzlichen Sequenzen sind nicht so lang, daß sie eine Hybridisierung der Primer mit den Bindesequenzen auf der nachzuweisenden Nukleinsäure, z. B. dem HCV-Genom, verhindern.

- In einer weiteren Ausführungsform sind das 5'-Ende des einen Primers und das 5'-Ende
- 20 des anderen Primers miteinander kovalent verknüpft. Zwischen den 5'-Enden der Primer können sich beispielsweise die angrenzenden humanen Sequenzen befinden.

Bevorzugt binden die Primer an die Bindesequenzen A bzw C', wie oben beschrieben, und die Sonde an einen zwischen den Enden der Bindesequenzen A und C' gelegenen Bereich B oder das Komplement davon.

- 25 Auch wenn mindestens eine Sequenz aus den 3 Bindesequenzen der beiden Primer und der Sonde nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure ist, bleibt die Gesamtspezifität des Nachweisverfahrens erhalten. Ist eine der Primersequenzen nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, sondern bindet auch an andere

Nukleinsäuren, kann kein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt auf der anderen Nukleinsäure gebildet werden, da die zweite Primerbindungssequenz auf dieser anderen Nukleinsäure fehlt. Unspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte auf der anderen Nukleinsäure werden nicht detektiert, wenn die spezifische Bindungssequenz für die Sonde fehlt. Ist auch die zweite Primersequenz nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, kann nur dann ein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt auf der anderen Nukleinsäure gebildet werden, wenn beide Primerbindungssequenzen in der gleichen Nukleinsäure-Vermehrungseinheit sind. Dieses Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt wird ebenfalls nicht detektiert, da die spezifische Bindungssequenz für die Sonde fehlt. Ist die Sondensequenz nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, jedoch die beiden Primer spezifisch, werden keine Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte der anderen Nukleinsäure gebildet. Ist zusätzlich zur Sondensequenz auch eine der beiden Primersequenzen nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, kann wiederum kein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt der anderen Nukleinsäure gebildet werden. Unspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte der anderen Nukleinsäure, die möglicherweise gebildet werden, enthalten andere Sequenzen im Sondenbindungsbereich und werden daher nicht detektiert. Sind alle drei Bindungssequenzen für die beiden Primer und die Sonde nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, wird kein Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt gebildet, wenn mindestens eine der beiden Primersequenzen nicht in einer Nukleinsäure-Vermehrungseinheit der anderen Nukleinsäure liegt. Liegt die Sondensequenz nicht in der Nukleinsäure-Vermehrungseinheit der beiden Primersequenzen für die andere Nukleinsäure, kann zwar ein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt der anderen Nukleinsäure gebildet, aber nicht detektiert werden. Der einzige Fall, daß ein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt der anderen Nukleinsäure gebildet und detektiert werden kann, ist, wenn alle drei Sequenzen innerhalb eines Nukleinsäure-Vermehrungsbereichs liegen. Dies kann jedoch durch entsprechende Sequenzauswahl der Nukleinsäure-Vermehrungseinheit vermieden werden.

Eine weitere Möglichkeit, Primer und Sonden gezielt unselektiv zu machen, besteht in der Verwendung degenerierter Basen innerhalb der Sequenz. Dabei wird zweckmäßigerweise die Region, in der die Hybridisierung der Targetnukleinsäure mit dem Primer oder der Sonde stattfinden soll, so gewählt, daß relativ wenig Unterschiede
5 zwischen der Targetsequenz und einer anderen, jedoch nicht nachzuweisenden Sequenz (z. B. eines anderen Mikroorganismus) bestehen. Die noch bestehenden Unterschiede können durch den Einsatz degenerierter Basen an den differierenden Basenpositionen weitgehend ausgeglichen werden. So lassen sich Unterschiede von Primern (A bzw. G) durch den Einbau der Base P (6H, 8H-3,4-dihydro-pyrimido[9,5-C][1,2]oxazin-7-on,
10 z. B. Nucleic Acids Research, Vol. 17, 24, 1989, p. 10373-10383) ausgleichen. Dasselbe gilt für Pyrimidine mit der Base K (Nucleorides & Nucleotides, 16 (7-9), 1507-1511 (1997)). Eine noch stärkere Degenierung ist durch den Einsatz von Inosin möglich (US-A-5,585,477; US-A-5,691,134; US-A-5,578,467; J.Biol.Chem. 260, 5, 2605-2608, 1985; Nucl.Acids Res. 1995, 23, 13, 2499-2505), da Inosin Basenpaarung mit allen vier
15 Basen erlaubt.

Eine weitere Möglichkeit, nichtkomplementäre Basen einzusetzen, ist der Ersatz von A durch D (Diaminopurine oder/und der Ersatz von C durch M (Methylcytosin).

Eine weitere Möglichkeit der Erzeugung von unspezifischen Primern und Sonden ist durch das Mischen von 2 oder mehr Sequenzen gegeben. so kann beispielsweise eine
20 Primersequenz einen für einen ersten Organismus, z. B. HCV, spezifischen Teil und einen für einen anderen Organismus, z. B. HGBV-B, spezifischen Teil enthalten. Diese (spezifischen) Teile können durch einen 1 bis 7 Nukleotide langen (gemeinsamen) Bereich getrennt sein. Die Organismen werden bevorzugt so gewählt, daß sie wahrscheinlich nicht in derselben Probe enthalten sind. Vorteile dieser
25 Ausführungsform sind, daß dieselben Primer für Nachweise von verschiedenen Organismen eingesetzt werden können und die Flexibilität der Auswahl größer ist.

In einer weiteren Ausführungsform findet die Herstellung der Amplifikate unter Einsatz von Nukleotiden, besonders bevorzugt Mononukleotiden, welche jeweils zu A, G, C

und/oder T komplementär sind, statt. Bevorzugt enthält der Bereich B bzw. B' der nachzuweisenden Nukleinsäure alle 4 natürlichen Nukleobasen.

In einer weiteren Ausführungsform des neuartigen Verfahrens können Teilkomponenten (Primer oder Sonden) der verschiedenen Primer-Sonden-Kombinationen für die
5 verschiedenen nachzuweisenden Nukleinsäuren identisch sein. Hierdurch wird die Bestimmung mehrerer Nukleinsäuretargets, z. B. für unterschiedliche Viren wie HBV, HTV und HCV mit einer einzigen Amplifikationsreaktion möglich (Multiplex). Ein technischer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß bei Mehrfachbestimmungen einer Probe ein hoher Grad an Übereinstimmung der Meßwerte
10 erreicht wird.

Im folgenden sollen die beiden Aspekte der vorliegenden Erfindung anhand eines Nachweises für HCV beschrieben werden. Die Nukleinsäuresequenz von HCV ist beispielsweise in EP-B-0 318 216 beschrieben. Die Sequenzen der beteiligten Komponenten sind in Figur 4 gezeigt. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht den
15 hochspezifischen und hochsensitiven Nachweis von Virus-Nukleinsäuren wie z. B. HCV-RNA aus der 5'-nichttranslatierten Region des HCV-Genoms in einer Kopienzahl von 10 Kopien pro Test mit einem dynamischen Bereich von 105 bedingt durch ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis. Dies ist insofern überraschend, da bei dem Test Primer und Sonden einsetzbar sind, die ein für den Fachmann nicht bevorzugtes
20 Primer/Sonden-Design aufweisen, nämlich z. B. Sequenzabschnitte, die zur Primer-Dimer-Bildung neigen, oder Basenfehlpaarungen nahe dem 3'-Ende. Die kurze Sonde hat einen Schmelzpunkt nahe der Testtemperatur, so daß der Fachmann keine stabile Bindung der Sonde an das Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt erwartet hätte. Bei den bisherigen Tests mit den längeren, fünfteiligen Nukleinsäure-Vermehrungsprodukten
25 wurde eine Spezifitäts- und Sensitivitätserhöhung bisher nicht über eine Verkürzung, sondern vielmehr eher über eine Verlängerung der Primer-Sonden-Sequenzen und/oder des Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts mit den signalgebenden Komponenten versucht.



Der Nachweis von HCV-RNA ist überraschenderweise trotz der kurzen vermehrten Sequenz der nachzuweisenden Nukleinsäure auch spezifisch und reproduzierbar in positiven HCV-Plasmaproben möglich, in denen die HCV-RNA nicht sequenzspezifisch vorgereinigt wurde, sondern direkt aus lysierten und über Glasoberflächen aufkonzentrierten Plasmaproben eingesetzt wurde. HCV-negative Plasmaproben ergeben kein Signal. Dies ist insofern überraschend, als das HCV-RNA-Genom sehr labil ist gegenüber Fragmentierung in Plasma-Lysaten. Mit z. B. HIV-Plasmaproben, HBV-Serumproben, Chlamydiaproben aus Urin oder Human-DNA-Proben aus Vollblut, die ebenfalls über Glasoberflächen aufkonzentriert wurden, wird mit den eingesetzten Primern und Sonden ebenfalls kein Signal erhalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann verwendet werden, um einen oder mehrere der für den Stand der Technik geschilderten Nachteile zu vermeiden oder um einen oder mehrere der folgenden Vorteile zu realisieren. Die PCR-Zyklen können sehr viel kürzer sein. Die Gesamtzeit der Nachweisverfahren kann dadurch verkürzt werden. Die Sensitivität des Nachweises kann erhöht werden, da weniger Konkurrenz/Verdrängung zwischen dem kurzen Gegenstrang des Amplikons und der Detektorsonde stattfinden kann. Die Spezifität des Nachweises wird erhöht, da der relative Anteil der internen Detektorregion gegenüber der gesamten Amplikonlänge erhöht wird. Die Differenzierbarkeit von Subtypen kann erhöht werden. Der Nachweishintergrund kann gesenkt werden, da kurze Amplika weniger Potential für unspezifische Hybridisierung mit sich bringen. Aus diesem Grund kann das Signal-Rausch-Verhältnis erhöht werden. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse kann erhöht werden, da kleinere Targetregionen auf RNA-Genomen weniger sensitiv für RNA-Abbau sind. Die Möglichkeiten zur Ausbildung von Sekundärstrukturen werden reduziert.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert:

Allgemeines

Alle verwendeten Oligonukleotide sind linear und einzelsträngig.

Beispiel 1

Nachweis von HCV aus menschlichem Blut

5 a) Probenvorbereitung:

Die RNA-Isolierung aus Plasma erfolgte anhand folgenden Probenvorbereitungsprotokolls:

1. Plasma (420 µl) mit 80 µl Proteinase K (25 mg/ml) mischen und einige Sekunden vortexen
- 10 2. Zugabe von 500 µl Lysepuffer (inkl. 1 µg Carrier-RNA (polyA)/ml): 5,4 M Guanidinium-Thiocyanat; 10 mM Harnstoff; 10 mM Tris-HCl; 20 % Triton X 100; pH 4,4
3. vortexen und anschließend 10 min bei RT schütteln
4. Zugabe von 500 µl Isopropanol-MGP (6 mg magnetische Glaspartikel in Isopropanol)
- 15 5. vortexen und anschließend 20 min bei RT schütteln
6. Magnetseparation der MGPs
7. Überstand abnehmen und verwerfen
8. Zugabe von 750 µl Waschpuffer: 20 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,5;
- 20 70 % Ethanol
9. MGPs auf Vortex resuspendieren und erneute Magnetseparation
10. Waschvorgang insgesamt 5mal wiederholen
11. Zugabe von 100 µl DEMC-Wasser zur Elution
12. 15 min bei 80 °C schütteln

13. Magnetseparation

14. 10 µl des Eluats in die RT-PCR einsetzen

b) Klonierung und Präparation des RNA-Standards:

5 Der Wildtypstandard "pHCV-wt" wurde zunächst durch Amplifikation eines Abschnitts des HCV-Genoms mit den Primern KY80 (5'-gcagaaagcgtctagccatggcgt-3', SEQ.ID.NO.1) und KY78 (5'-ctcgcaagcaccctatcaggcagt-3', SEQ.ID.NO.2) gewonnen und das Amplikon anschließend über eine sog. "blunt-end"-Klonierung in den Vektor pBluescript SK+ kloniert. Nach Vermehrung der bakteriellen Zellen wurde das Plasmid isoliert,
10 durch restriktionsenzymatischen Verdau linearisiert und über eine in-vitro-Transkription das entsprechende RNA-Fragment gewonnen und aufgereinigt.

Die Quantifizierung der RNA erfolgte über photometrische Messung der Absorption bei 260 nm.

15 Alle hier beschriebenen molekularbiologischen Verfahren können einschlägigen Methodik-Büchern entnommen werden (e.g. Maniatis et al.; Ausubel et al.).

c) RT-PCR assay:

Die Amplifikation erfolgte mit den u.g. Reagentien und nach u.g. Cyclerprotokoll:

Reagentien	Endkonzentration im Mastermix
5 x RT-PCR-Puffer	1 x
MnOAc	2,5 mM
Tth-Polym.	10 u
dNTP-Mix	200 μ M (dATP, dCTP, dGTP) / 600 μ M (dUTP)
UNG	2u
Primer forw. HC2F	0.3 μ M (5'-agtatgtgtgtcgtgcagcc-3', SEQ.ID.NO.3)
Primer rev. HC1F-bio	0.3 μ M (5'-bio--tggtctctcccgaggagtg-5', SEQ.ID.NO.4)

Die Amplifikation wurde nach folgendem Cyclerprotokoll durchgeführt:

10 min	37 °C	Dekontamination durch UNG
30 min	60 °C	reverse Transkription
1 min	95 °C	Denaturierung
35 Zyklen:		
15 sec	94 °C	Denaturierung
20 sec	56 °C	Primer-Annealing und Elongation
7 min	72 °C	Elongation
hold	50 °C	

d) Detektion:

Die gesamte Detektionreaktion erfolgte vollautomatisiert an einem Elecsys®
 5 1010-Analyse-Automaten (Boehringer Mannheim GmbH). Kurzbeschreibung:

1. Entnahme von 10 μ l Amplifikat und 35 μ l Denaturierungslösung (BM-Id-No. 1469053)
2. Inkubation in einem Reaktionsgefäß für 5 min bei 37 °C
3. Zugabe von 120 μ l Hybridisierungslösung BM-Id-No. 146 9045 versetzt mit 25 ng/ml Ruthenium-markierter Sonde

4. Inkubation für 30 min bei 37 °C
 5. Zugabe von 35 µl einer Elecsys® SA Magnetbeadlsg. (BM-Id-No. 171 9556)
 6. Inkubation für 10 min bei 37 °C
 7. Messung der Elektrochemilumineszenz von 120 µl des Reaktionsgemisches
- 5 in der Elecsys® 1010-Meßzelle

Zur Hybridisierung wurden zwei unterschiedliche Ruthenium-gelabelte Sonden verwendet:

PNA-Sonde: Ru-(Ser)₂-TCCAGGACCC-Ser-Gly

DNA-Sonde: 5'-Ru-CTCCAGGACCCC-3', SEQ.ID.NO.5

Beispiel 2**Ermittlung der analytischen Sensitivität anhand einer RNA-Standard-Verdünnungsreihe**

- Amplifiziert wurden in Doppelbestimmungen 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 und 10^5 Kopien HCV-RNA-Standard. Als Kontrollen dienten ein HCV-negatives Plasma, ein HCV-positives Plasma (nach Probenvorbereitung) und Wasser. Nach Amplifikation wurden alle Proben gemessen (ECL-Detektion, Elecsys® 1010).

Ergebnis (Einheiten x 100):

Template	PNA-Sonde		DNA-Sonde	
	1.Best	2.Best.	1.Best	2.Best.
RNA-Std. 10^5 Kopien	30608	30186	16791	15772
RNA-Std. 10^4 Kopien	17895	15737	8977	7718
RNA-Std. 10^3 Kopien	4137	4345	1911	1931
RNA-Std. 10^2 Kopien	280	163	146	86
RNA-Std. 10^1 Kopien	95	76	47	37
HCV-positives Plasma	26658	26262	14996	14552
HCV-negatives Plasma	93	98	49	48
Wasser	61	45	19	15

- Die Verwendung der Primer HC2F/HC1F-bio führt zu einer sehr guten Amplifikation in der RT-PCR, gemessen an dem Signalniveau: Hierbei wird der gesamte Detektionsbereich des Elecsys® ausgenutzt (ca. 5 log-Stufen).
- Es erfolgt eine sehr gute Signalabstufung innerhalb der Verdünnungsreihe
- Der Background, gemessen an HCV-negativem Plasma und Wasser, ist relativ gering
- Es ist sowohl die Verwendung von PNA als auch DNA als Sonde möglich

Beispiel 3**Überprüfung der HCV-Assay-Spezifität**

Hierzu wurden unterschiedliche Ausgangsnukleinsäuren (human-genomische DNA; HIV-RNA, HBV-DNA, Chlamydia-DNA) mit den o.g. Primern und Sonden getestet.

- 5 Als Positiv-Kontrolle diente HCV-Plasma und als Negativ-Kontrolle HCV-Negativ-Plasma sowie Wasser.

Ergebnis (Einheiten x 100):

Template	PNA-Sonde		DNA-Sonde	
	1.Best	2.Best.	1.Best	2.Best.
Human-genomische DNA aus Vollblut	52	45	41	56
HIV-positives Plasma	43	60	39	33
HBV-positives Plasma	53	40	25	27
Chlamydia-positiver Urin	43	34	19	17
HCV-positives Plasma	11543	10644	6900	6348
HCV-negatives Plasma	65	67	45	40
Wasser	29	25	15	15

- 10 • Beide verwendeten Sonden (PNA, DNA) ergeben nur mit ihrem zugehörigen Analyten ein Signal in der ECL-Messung. Das bedeutet: Keine detektierbaren unspezifischen Amplifikationen mit den verwendeten Primern und Sonden.

Beispiel 4**Überprüfung der Sonden-Spezifität**

Für dieses Experiment wurden unterschiedliche Amplifikate anderer Analyten mit den jeweiligen spezifischen Primern hergestellt und dann gegen die o.g. PNA- und DNA-Sonden hybridisiert. Die Kontrolle der erfolgten Amplifikationen erfolgte mit der jeweiligen zugehörigen Analyt-Sonde.

Ergebnis (Einheiten x 100): (jeweils Mittelwert aus Doppelbestimmung)

Template	PNA-Sonde für HCV	DNA-Sonde für HCV	HIV-Sonde	HBV- Sonde	Chlamydia- Sonde
HIV	13	6	11908	nd	nd
HBV	13	13	nd	1384	nd
Chlamydia	10	10	nd	nd	3842
HCV	10132	9345	nd	nd	nd
Wasser	13	9	nd	nd	nd

- Die Kontrollreaktionen (HIV, HBV, Chlamydia) ergeben den deutlichen Nachweis von Amplifikat mit der entsprechenden Sonde.
- Die verwendeten PNA- sowie DNA-Sonden ergeben nur mit HCV ein spezifisches Signal.
- Es treten keine unspezifischen Hybridisierungen der PNA/DNA-Sonden mit anderen Amplifikaten auf.

Beispiel 5

Nachweis von HCV mit alternativen Primern

In Fig. 8 ist eine weitere Kombination von Primern mit einer Fangsonde angegeben, die keine freien Nukleotide im überspannten Bereich enthält. Das Amplicon ist nur 51

5 Basen(paare) lang.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Schritte
 - Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine Bindesequenz (A) eines Stranges der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine Bindesequenz C', die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C im wesentlichen komplementär ist, binden kann,
 - Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an die zwischen den Sequenzen A und C gelegene Sequenz B oder das Komplement davon binden kann, und
 - Nachweis der Bildung eines Hybrides aus einem Amplifikat und der Sonde, dadurch gekennzeichnet, daß die zwischen den Bindesequenzen A und C gelegene Sequenz keine Nukleotide enthält, die nicht dem aus der Bindesequenz D der Sonde und der hiervon gebundenen Sequenz des Amplifikats gebildeten Sequenzbereich E zugehören.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindesequenz D der Sonde mit einer oder beiden Bindesequenzen der Primer überlappt.
3. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer an seinem nicht verlängerbaren Teil Nukleotide aufweist, die nicht direkt mit der nachzuweisenden Nukleinsäure oder ihrem Komplement hybridisieren.
4. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Bindesequenzen nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist.

5. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Gesamtlänge der Bindesequenzen von dem von der Bindesequenz der Sonde wegweisenden Teil der Bindesequenz des einen Primers bis zu dem ebenfalls von der Bindesequenz der Probe wegweisenden Teil des anderen Primers kleiner ist als 100 Nukleotide.
5
6. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer immobilisierbar und die Sonde nachweisbar markiert ist.
7. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nachweisbar und die Sonde immobilisierbar markiert oder immobilisiert ist.
10
8. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde sowohl durch einen Fluoreszenzquencher als auch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist.
9. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß einer der Primer durch eine erste Energietransferkomponente und die Sonde durch eine zweite, davon verschiedene Energietransferkomponente markiert ist.
15
10. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikat durch physikalische und/oder spektroskopische Methoden detektiert wird.
20
11. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß zwei der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch sind.
25

13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde nicht spezifisch ist für die nachzuweisende Nukleinsäure.
14. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der Amplifikation jeweils zu A, G, C und T komplementäre Nukleotide
5 eingesetzt werden.
15. Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Schritte
- Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine Bindesequenz A der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine Bindesequenz
10 C', die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C komplementär ist, binden kann, und Nachweis der Amplifikate mittels Massenspektroskopie.
16. Verfahren zum spezifischen Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Schritte
- Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe mindestens zweier Primer,
15
 - Inkontaktbringen der Amplifikate mit einer Sonde, welche an das Amplifikat binden kann, und
 - Nachweis der Bildung eines Hybrides aus dem Amplifikat und der Sonde,
- dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nicht für die
20 nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß zwei der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch sind.
18. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 16 und 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde nicht spezifisch ist für die nachzuweisende Nukleinsäure.

19. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß in der Amplifikation jeweils zu A, G, C und T komplementäre Nukleotide eingesetzt werden.

Fig. 1

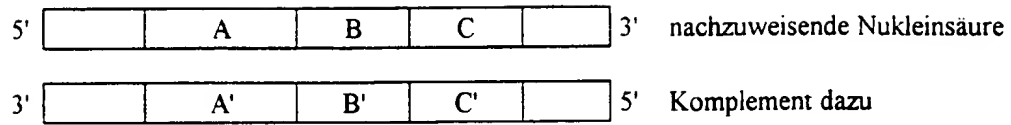
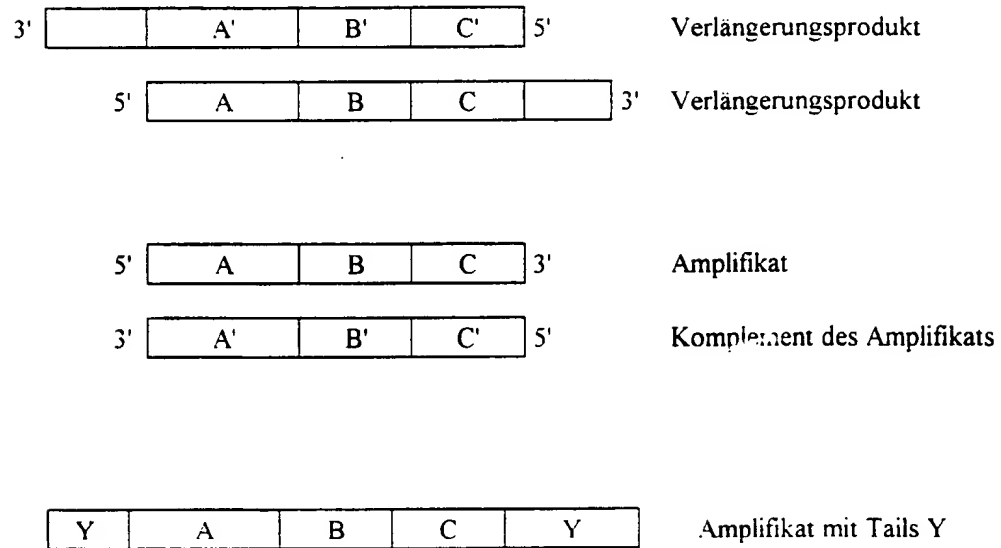


Fig. 2



2/7

Fig. 3

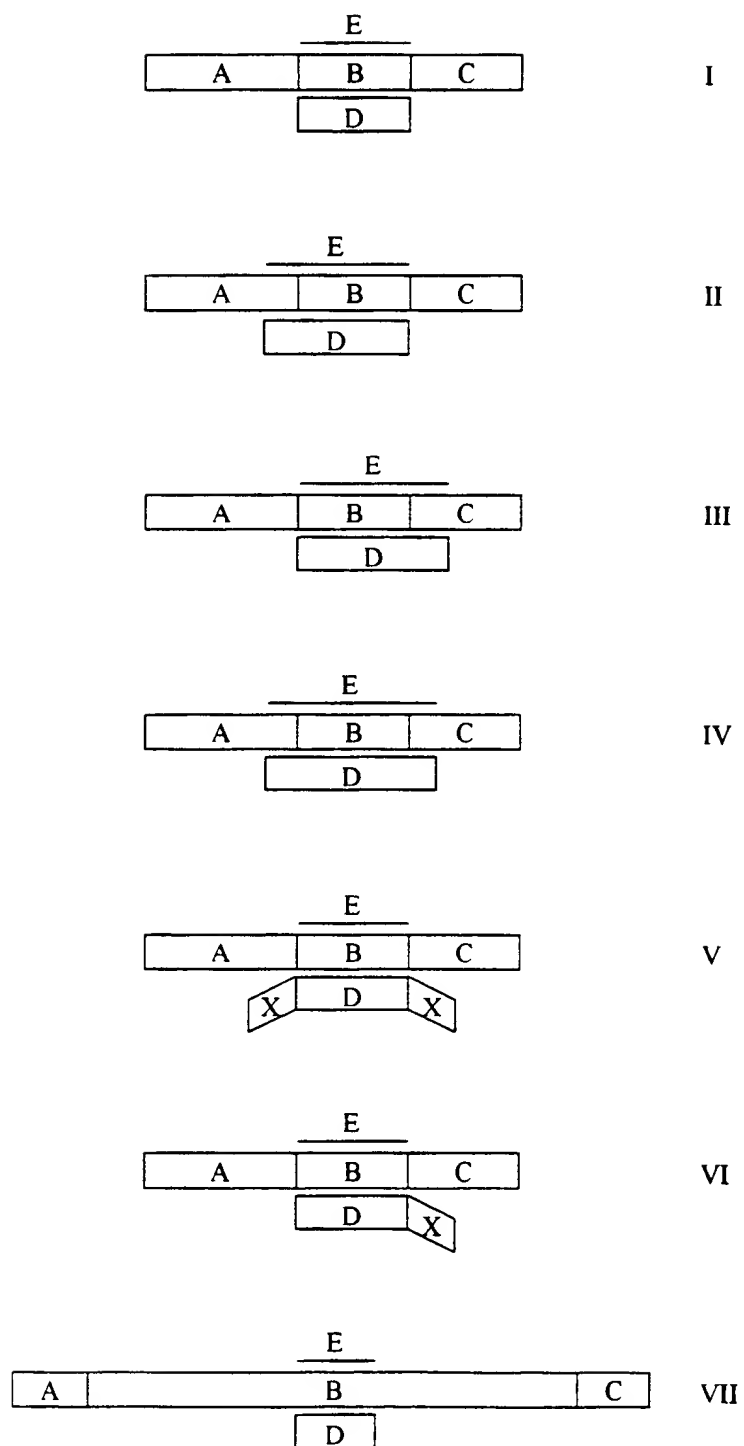


Fig. 4

HCV	AGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCA
HUMAN	AGTATGIGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCACTCCCGGGAGAGCCA

4/7

FIG. 5

HCV_MCR01	AGTATGTGTGTCGTGCAGCC	
MPF1		CCAGGACCCCCACTCCCGG
MPF1+1		TCCAGGACCCCCACTCCCGG
MPF2		CCAGGACCCCCACTCC
HCV_1A	AGTATGAGTGTGTCGTGCAGCCTCCAGGCCCCCCCTCCCGGAGAGCCA	
HCV_1B	AGTATGAGTGTGTCGTGCAGCCTCCAGGCCCCCCCTCCCGGAGAGCCA	
HCV_2B	AGTATGAGTGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGAGAGCCA	
HCV_MCR	AGTATGTGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGAGAGCCA	
MPR1_rev&comp1	GTGTGTCGTGCAGCCTCCAGGA	
MPR2_rev&comp1	TCGTGCAGCCTCCAGGA	
HCV_MCR02_rev&comp1		CCACTCCCCGGAGAGCCA
#1	-----	

FIG 6

HCV	261	5'-GGTACTGCCTGATAGGGTCTTGGAGTGCCCGGGAGTCTCGTAGACCGTGCACCATGA-3'	333
Forward primer CK10/Reverse primer CK20	5'-CGTACTGCCTGATAGGGTCT-3'		3'-CAGAGMATMTGGMATCGTGTAMG-5'
Forward primer CK11/Reverse primer CK20	5'-CGTACTGCCTGATAGGGTGC-3'		3'-CAGAGMATMTGGMATMTGTGTAMG-5'
Forward primer CK10-1/Reverse primer CK20-1			3'-CDGDIIMDTMTGGMATMTGTGTAMG-5'
Forward primer CK11-1/Reverse primer CK20-1			3'-CDGDIIMDTMTGGMATMTGTGTAMG-5'
Forward primer CK10-2/Reverse primer CK20-2			3'-MDGDIIMDTMTGGMAPPKPGTAMG-5'
Forward primer CK11-2/Reverse primer CK20-2			3'-MDGDIIMDTMTGGMAPPKPGTAMG-5'
Forward primer CK10/Reverse primer CK21			3'-CTTCAGAGCATCTGGCATCGTGTACG-5'
Forward primer CK10-1/Reverse primer CK21-1			3'-CTTMDGDIIMDTMTGGMATMTGTGTAMG-5'
Forward primer CK11-1/Reverse primer CK21-1			3'-CTTMDGDIIMDTMTGGMATMTGTGTAMG-5'
Forward primer CK10-1/Reverse primer CK21-2			3'-CTTMDGDIIMDTMTGGMATMTGTGTAMG-5'
Forward primer CK11-1/Reverse primer CK21-2			3'-CTTMDGDIIMDTMTGGMATMTGTGTAMG-5'
Forward primer CK10-2/Reverse primer CK21-3			3'-MTTMDGDIIMDTMTGGMAPPKPGTAMG-5'
Forward primer CK11-2/Reverse primer CK21-3			3'-MTTMDGDIIMDTMTGGMAPPKPGTAMG-5'
HGBV-B	389	5'-CGTACTGCCTGATAGGGTCTTGGAGGGGATCTGGGAGTCTCGTAGACCGTGCACCATGC-3'	449

FIG 7

HCV	261	5'-GGTACTGCTGTAGGGTCTTCGAGTGCCCGGAGGTCCTCGTAGACCGTGACCATGA-3'	333
Forward primer CK12/Reverse primer CK22		5'-CGTAMTGMTATAGGGT-3'	3'-CCATCAGAGCATCTGGCATCGGTGTACG-5'
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK22-1		5'-CGTAMTGMTATAGGGT-3'	3'-CMTTMAAGATMAATMTIGMATMGTTGTAMG-5'
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK22-2		5'-CGTAMTGMTATAGGGT-3'	3'-CMTMPAAGATMAATMTGGMATMGTTGTAMG-5'
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK22-3		5'-CGTAMTGMTATAGGGT-3'	3'-MTMPAAGATMAATMTGGMATMGTTGTAMG-5'
Forward primer CK12-2/Reverse primer CK22-4		5'-CGTDMTGMTIDTGGGT-3'	3'-CMTMPAAGATMAATMTIGMAPPKPGTAMG-5'
Forward primer CK12-2/Reverse primer CK22-5		5'-CGTDMTGMTIDTGGGT-3'	3'-MTMPAAGATMAATMTGGMAPPKPGTAMG-5'
Forward primer CK12/Reverse primer CK23		5'-CGTAMTGMTATAGGGT-3'	3'-CCATCAGAGCATCTGGCATCGGTGTACG-5'
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK23-1		5'-CGTAMTGMTATAGGGT-3'	3'-CMTMAAGAGMTMTGGMATMGTTGTAMG-5'
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK23-2		5'-CGTAMTGMTATAGGGT-3'	3'-CMTMKAGAGMTMTGGMATMGTTGTAMG-5'
Forward primer CK12-2/Reverse primer CK23-3		5'-CGTDMTGMTIDTGGGT-3'	3'-MTMKAGAGMTMTGGMAPPKPGTAMG-5'
Forward primer CK12/Reverse primer CK24		5'-CGTAMTGMTATAGGGT-3'	3'-CCTCAGGAGCGTCTGGCATCGGTGTACG-5'
Forward primer CK12/Reverse primer CK24-1		5'-CGTAMTGMTATAGGGT-3'	3'-CMTMAAGAGMTMTGGMATMGTTGTAMG-5'
Forward primer CK12-1/Reverse primer CK24-2		5'-CGTAMTGMTATAGGGT-3'	3'-CMTMKKAGAGMTMTGGMATMGTTGTAMG-5'
Forward primer CK12-2/Reverse primer CK24-3		5'-CGTDMTGMTIDTGGGT-3'	3'-MTMKKAGAGMTMTGGMAPPKPGTAMG-5'
HGBV-B	389	5'-CGTACTGCTGTAGGGTCTTCGAGGGGATCTCGTAGACCGTAGCATGC-3'	449

7/7

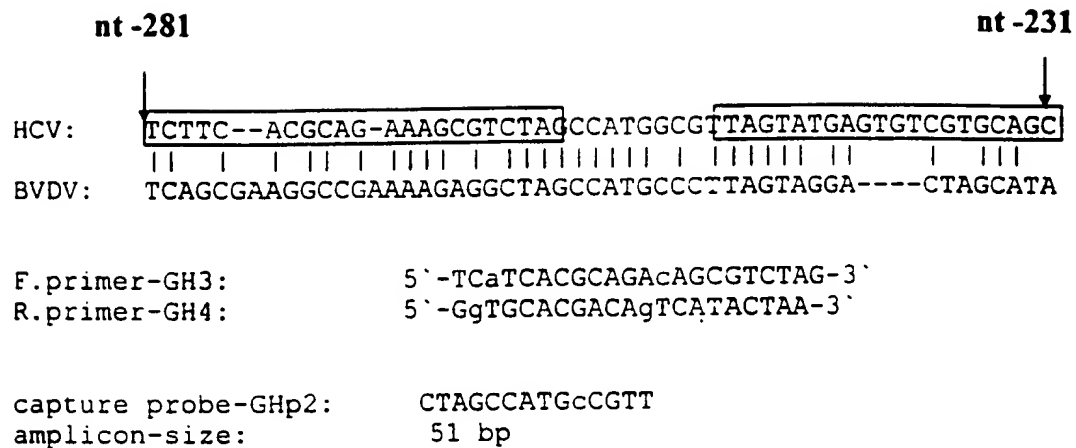


FIG. 8

SEQUENZPROTOKOLL**(1) ALLGEMEINE ANGABEN:****(i) ANMELDER:**

(A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH

5 (B) STRASSE: Sandhoferstr. 116

(C) ORT: Mannheim

(E) LAND: DE

(F) POSTLEITZAHL: 68305

(G) TELEFON: 0621 759 4348

10 (H) TELEFAX: 0621 759 4457

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:

Spezifisches und sensitives Nukleinsäurenachweisverfahren

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5**(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:**

15 (A) DATENTRÄGER: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GCAGAAAGCG TCTAGCCATG GCGT

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

5 (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

10

CTCGCAAGCA CCCTATCAGG CAGT

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

15 (A) LÄNGE: 21 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure

20 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

AGTTATGTGT GTCGTGCAGC C

21

25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

30 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

5 TGGCTCTCCC GGGAGTGG 18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

10 (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligodeoxyribonukleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

15

CTCCAGGACC CC 12